

Oona Mäki

DNA-eristysmenetelmien vertailu MRSA:n ja MRSP:n tunnistamiseen multiplex qPCR -tekniikalla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioalan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

17.11.2017

Tekijä Otsikko	Oona Mäki DNA-eristysmenetelmien vertailu MRSA:n ja MRSP:n tunnistamiseen multiplex qPCR -tekniikalla
Sivumäärä Aika	36 sivua + 3 liitettä 17.11.2017
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaaja(t)	Dosentti, tarttuvien eläintautien erikoiseläinlääkäri Merja Rantala ELT, tarttuvien eläintautien erikoiseläinlääkäri Thomas Grönthal Tutkintovastaava Jarmo Palm
<p>Resistentit stafylokokkibakteerit, metisilliinille resistentit <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ja <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> (MRSP), ovat yleistyneet taudinaiheuttajina eläimillä. Kyseisten bakteerien kantajia etsitään laboratorioissa biokemiallisia tunnistusmenetelmiä käyttäen, jonka lisäksi positiiviset ja epävarmat tulokset varmistetaan usein PCR-menetelmän avulla.</p> <p>Opinnäytetyön tavoitteena oli löytää Helsingin yliopiston eläinlääketieteellisen tiedekunnan kliinisen hevos- ja pieneläinlääketieteen osaston mikrobiologian laboratorion käyttöön so- piva DNA-eristysmenetelmä. Menetelmällä MRSP/A-seulontanäytteiden rikastusliemestä eristettyä DNA:ta käytettäisiin MRSA:n ja MRSP:n tunnistamiseen suunnitellussa multiplex qPCR-testissä, jonka geenikohteina ovat <i>S. aureus nuc</i>, <i>S. pseudintermedius nuc</i>, sekä <i>mecA</i>- ja <i>mecC</i>-geeni. Menetelmän tuli olla mahdollisimman yksinkertainen, edullinen ja vähiten työntekijän aika kuluttava, mutta kuitenkin tarpeeksi herkkä ja luotettava.</p> <p>Menetelmiä vertailtiin ensisijaisesti jo aikaisemmin laboratoriossa käytössä olleeseen PCR-reaktioita inhiboivia aineita sitovaan resiniinipohjaiseen menetelmään, joka sisälsi näytteen sentrifugointia, pesua, resuspensointia ja inkubointia. Tätä liian työlästä ja hidasta menetelmää muunnettiin kolmeksi erilaiseksi menetelmäksi, joissa oli vähennetty pesu- ja sentrifugointivaiheita tai lyhennetty inkubaatioaikaa. Lisäksi testattiin Nordiag Arrow -eristysautomaatin Bugs N' Beads -kittiä. Eri menetelmillä eristettyä DNA-näytteitä vertailtiin mittaamalla niiden DNA-konsentraatioita NanoDrop-spektrofotometrillä sekä ajamalla ne in-house multiplex qPCR:llä. Testejä tehtiin kolmella tunnetulla bakteerikannalla sekä näiden seoksella, jonka jälkeen simuloiduilla potilasnäytteillä ja 39 varsinaisella, jo kliinisesti tutkitulla näytteellä.</p> <p>Vertailun perusteella käyttöön saatiin manuaalinen menetelmä, johon ei kuulunut alkupe- räisen menetelmän pesuvaihetta ja jonka inkubointivaiheet olivat nopeammat. Eris- tysautomaatilla eristetty DNA ei eronnut huomattavasti laboratoriolle halvemmalla mene- telmällä eristetystä DNA:sta. Kaikkein nopeimmalla ja halvimmalla menetelmällä eristetyn DNA:n konsentraatio oli liian alhainen heikentäen menetelmän herkkyttä.</p>	
Avainsanat	DNA-eristys, DNA, PCR, mikrobiologia, MRSA, MRSP

Author(s) Title	Oona Mäki Comparison of DNA Isolation Methods for Identifying MRSA and MRSP with Multiplex qPCR
Number of Pages Date	36 pages + 3 appendices 17 November 2017
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructor(s)	Merja Rantala, Docent, DVM, Specialist in Infectious Animal Diseases Thomas Grönthal, PhD, DVM, Specialist in Infectious Animal Diseases Jarmo Palm, Senior lecturer
<p>Methicillin resistant staphylococci, <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) and <i>S. pseudintermedius</i> (MRSP), have become a real problem as pathogens in animals. In laboratories, carriers are identified by using biochemical tests. Positive and uncertain results are usually verified with PCR, which detects the genes in the bacteria that cause methicillin-resistance.</p> <p>The purpose of this Bachelor's study was to discover a suitable DNA isolation method for the Clinical microbiology laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki. The method would be used to identify MRSA and MRSP with multiplex qPCR technique, in which target genes were <i>S. aureus nuc</i>, <i>S. pseudintermedius nuc</i>, <i>mecA</i>-gene and <i>mecC</i>-gene. The new method would have to be as affordable and rapid for an employee as possible, but at the same time sensitive and reliable enough.</p> <p>Three different methods were compared to the resin-based original method, which included centrifugation, washing, resuspensions and incubations. The alternative methods were simplified variations of the original method by cutting the steps and reducing the incubation times of the isolation. In addition of these methods, an automatic isolation, Nordiag Arrow -instrument and Bugs N' Beads -kit, was tested. Isolated DNA was analyzed by measuring the DNA concentration and purity with a NanoDrop spectrophotometer, and using the in-house multiplex qPCR. At first, three different bacterial control strains and a mixture of them were used, followed by simulated specimens and 39 genuine, clinically tested patent specimens in enrichment broth.</p> <p>As a result a the method, which will be used in the future, was discovered. The method does not include any wash steps and the incubation times are lower than in the original method. The DNA isolated with the automatic instrument did not significantly differ compared to the DNA isolated with the manual methods. The DNA yield of the fastest and most affordable extraction method was so low, that it affected the sensitivity of the method.</p>	
Keywords	DNA, isolation, PCR, microbiology, MRSA, MRSP

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Kirjallisuuskatsaus	2
2.1	DNA-eristys	2
2.1.1	DNA:n konsentraatio ja puhtausaste	3
2.2	PCR-menetelmä ja qPCR	3
2.2.1	Multiplex-PCR	4
2.3	<i>Staphylococcus</i> -bakteerit	5
2.3.1	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	5
2.3.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.3.3	Metisilliiniresistentit stafylokokit	6
2.3.4	MRS-bakteerin toteaminen koiralla	7
3	Menetelmät ja materiaalit	7
3.1	DNA-eristysmenetelmät	7
3.1.1	Manuaaliset menetelmät	8
3.1.2	Eristysautomaatti	9
3.2	Käytetyt bakteerikannat	9
3.3	DNA-konsentraation ja puhtausasteen mittaus	10
3.4	PCR-ajot	11
3.4.1	Alukkeet ja koettimet	11
3.4.2	PCR-protokolla	12
3.5	Työn toteutus	13
3.6	Kliiniset potilasnäytteet	15
3.7	Kustannusten ja ajankäytön vertailu	16
4	Tulokset ja tulosten tarkastelu	16
4.1	Eristysmenetelmien vertailu	16
4.1.1	DNA-konsentraatio ja puhtausaste	16
4.1.2	Menetelmien PCR-tulokset	18
4.1.3	Eristysautomaatin PCR-tulokset	21
4.2	Simuloidut ja kliiniset potilasnäytteet	23
4.3	Kustannusten ja ajankäytön vertailu	30
4.4	Lopputulos	32
4.5	Käytännön työskentely	33

Liitteet

Liite 1. NanoDrop-mittauksia

Liite 2. Eristysautomaatilla eristettyjen DNA-näytteiden NanoDrop-mittaukset

Liite 3. Ensimmäiset testiajot

Lyhenteet

MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> . Metisilliiniresistentti <i>S. aureus</i> .
MRSP	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius</i> . Metisilliiniresistentti <i>S. pseudintermedius</i> .
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> . Fosfaattipuskuroitu, vesipohjainen, isotoninen suolaliuos sisältäen natriumvetyfosfaattia ja natriumkloridia, sekä joskus kaliumkloridia ja kaliumdivetyfosfaattia.
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> . Polymeraasiketjureaktio.
TSB	<i>Tryptic soy broth</i> . Kliinisessä mikrobiologiassa elatusaineena ja rikastusliemenä käytetty liuos, joka sisältää tryptonia, soijaa, glukosia, natriumkloridia ja dikaliumfosfaattia.

1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston Eläinlääketieteellisen tiedekunnan mikrobiologian laboratoriossa keväällä 2016. Laboratorioon tulevat näytteet tulevat sekä Yliopistollisesta eläinsairaalasta, että ulkopuolisilta eläinlääkäriasemilta. Tässä työssä vertailtiin yhteensä viittä erilaista DNA-eristysmenetelmää, joista parhaaksi todettua tultaisiin käyttämään laboratoriossa käytössä olevassa in-house multiplex-PCR -testissä. Tarkoituksena oli saada selville, mikä menetelmistä olisi yksinkertaisin, nopein, halvin ja vähiten työvaiheita sisältävä menetelmä, joka olisi kuitenkin niin luotettava, että se voitaisiin ottaa käyttöön jokapäiväisessä laboratoriotyöskentelyssä. Menetelmällä eristettyä DNA:ta käytetään templaattina in-house multiplex-qPCR -testissä, joka on tarkoitettu metisilliinille resistenssien *Staphylococcus aureus* (MRSA) ja *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) -bakteerien seulontaan.

Stafylokokit kuuluvat eläinten normaalimikrobistoon. Resistenttejä kantoja stafylokokeista voi löytyä oireilevilta eläimiltä tulehdusalueilta otetuista näytteistä, minkä lisäksi myös oireettomia, mahdollisesti esimerkiksi sairaalasta tartunnan saaneita riskipotilaita tutkitaan MRSA:n ja MRSP:n varalta seulontanäyttein. Fenotyyppisten testien perusteella resistentit tai epäilyttävät bakteerikannat varmistetaan PCR-menetelmällä, joka tunnistaa bakteereista yleisimmän resistenssiä koodaavan geenin.

Tässä työssä vertailtiin neljää uutta MRSP:n ja MRSA:n tunnistukseen käytettävää DNA-eristysmenetelmää yhteen laboratoriossa aiemmin testattuun menetelmään, joka oli todettu liian työlääksi ja hitaaksi käytettäväksi rutiinitöissä. Testejä tehtiin aluksi tunnetuilla bakteerikannoilla, joista siirryttiin sekä simuloituihin että varsinaisiin potilasnäytteisiin.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 DNA-eristys

DNA:n eristys näytteestä on välttämätöntä ennen PCR-ajoa. Eristys voidaan tehdä teoriassa mistä vain biologisesta materiaalista ja DNA:ta eristetäänkin esimerkiksi kudoksista, soluista ja viruksista. Eristysmenetelmä ja siihen tarvittavat reagenssit valitaan aina sen mukaan, millaiset näytteet ovat käytössä ja mikä DNA:n käyttötarkoitus on. Lopputuotteen tulisi aina olla mahdollisimman puhdas ja sisältää vain DNA:ta (tai RNA:ta eristettäessä RNA:ta). Tuotteen puhtaus vaikuttaa aina suoraan lopputulokseen, sillä epäpuhtaudet häiritsevät menetelmän herkkyyttä.

Eristysmenetelmiä ja erilaisia protokollia on lukuisia, joista yksinkertaisin on pelkkä keittäminen. Kaupalliset kitit DNA:n eristykseen ovat myös suuressa suosiossa. Menetelmät jaotellaan kahteen ryhmään: liuoksesta tehdyt eristykset, sekä kiinteästä materiaalista tehdyt eristykset. DNA-eristyksen vaiheisiin kuuluu usein solujen hajottamista, DNA:n kiinnittämistä, pesuvaiheita ja eluutiovaihe. Nämä voivat vaihdella protokollan mukaan [Tan Siun Chee, Chin Beow, 2009]. DNA:n eristysvaiheet perustuvat kaikki DNA:n puhdistamiseen epäpuhtauksista, kuten proteiineista ja RNA:sta, muun muassa saostamalla joko niitä tai DNA:ta erilaisilla yhdisteillä. Nukleiinihappoja saostaessa ne kiinnitetään, eli neutraloidaan kationeilla suoloiksi, jolloin ne eivät liukene alkoholiin. Eluutiovaiheessa kiinnittynyt, puhdas DNA liuotetaan takaisin nesteeseen [Alaska BioPREP Virtual Textbook, 2017].

Tässä työssä käytetyissä, käsin tehdyissä eristysmenetelmissä käytettiin DNA:n puhdistamiseen matriksia, joka sitoo solun lyysausvaiheessa PCR-reaktiota haittaavia tuotteita ja näin matriksin avulla eristetty DNA on suoraan valmis käytettäväksi PCR-ajossa [Bio-Rad, 2016]. Matriksin resiini, Chelex-yhdiste, puhdistaa aineita ioninvaihdon avulla. Chelex suojaa näytettä DNAaseilta, jotka voivat tuhota DNA:n, sitomalla niiden ko-faktoreina käyttämiä magnesiumioneita. [Bio-Rad, 2000].

Eristysautomaatin protokollana tässä työssä käytettiin Nordiag Arrow -automaatin Bugs'n beads -kittiä. Se on tarkoitettu erityisesti bakteerien ja joidenkin virusten eristämiseen etenkin vaikeista näytteistä, joissa on paljon DNA:sta eriteltävää ainesta.

Bakteerit kiinnitetään magneettipartikkeleihin, jolloin ylimääräinen näyte saadaan poistettua. Automatiikan lisäksi eristysautomaatin hyötyjä ovat muun muassa työvaiheiden vähyyys sekä näin kontaminaatoriski pieneneminen. [Isogen Life Science, 2016.]

2.1.1 DNA:n konsentraatio ja puhtausaste

DNA-konsentraatiota ja puhtausastetta käytetään arvioimaan näytteen laatua. Mikäli näytteessä ei ole epäpuhtauksia, on absorbanssimittausten lukuarvojen osamäärä (260 nm/280 nm) 1,8. Mikäli luku on tätä pienempi, näyte todennäköisesti sisältää aallonpituudella 280 absorboivia proteiineja, joka kertoo täydellisen eristyksen epäonnistumisesta. Suuremman suhdeluvun antavassa näytteessä on luultavasti RNA:ta, joka ei kuitenkaan PCR:ää tehdessä pitäisi haitata tulosta. [Haajanen ym. 2013].

Tässä työssä DNA-konsentraatio ja puhtausaste mitattiin NanoDrop 2000 -UV-Vis spektrofotometrillä (Thermo Scientific™) käyttäen absorbanssiarvoja aallonpituuksilta 260 nm ja 280 nm. Laitteen aallonpituusalue on 190–840 nm, joka mahdollistaa monien erilaisten näytteiden mittaamisen. Näytteitä ei tarvitse laimentaa, ja niitä kuluu yhteen mittaukseen vain 0,5–2 µl.

2.2 PCR-menetelmä ja qPCR

Polymeraasiketjureaktiossa (Polymerase chain reaction) eli PCR:sä monistetaan kahden oligonukleotidialukkeen välinen DNA-jakso, jonka pituus voi vaihdella alle sadasta tuhansiin emäspareihin. Reaktio koostuu kolmesta eri vaiheesta, joita yhdessä kutsutaan sykleiksi: denaturaatiovaihe, annealing- eli kiinnittymisvaihe ja replikaatiovaihe. PCR-reaktion toimivuuteen vaikuttaa hyvin moni tekijä, ja esimerkiksi eri entsyymien käyttö vaikuttaa reaktio-olosuhteisiin. Menetelmässä PCR-sykli tapahtuu useita kertoja, jotta monistettua saadaan useita DNA-jaksoja. [Haajanen, Pärssinen & Suominen, 2013].

Kvantitatiivinen PCR eli qPCR on menetelmä, jossa fluoresoivan väriaineen avulla saadaan selville tuotteen määrä ajan funktiona. Laite piirtää väriaineen fluoresenssin intensiteetin perusteella kuvaajan, jonka avulla voidaan analysoida niin tuotteen muodostumisen aloitus-, huippu- kuin lopetushetkikin. Monistuminen loppuu yleensä silloin, kun reaktiossa olleet reagenssit on kulutettu loppuun.

Fluoresoivia leimoja on monia erilaisia, joita käytetään tarpeen mukaan. Joitain väriaineita käytetään myös muissa sovelluksissa kuin qPCR:ssä, kuten Texas Red -leimaa (sulforhodamine 101 acid chloride), joka fluoresoi punaisena parhaiten aallonpituudella 561 tai 594 nm [Thermo Fisher Scientific Inc, 2015]. FAM on nimenomaan DNA-sekvensoinnissa hyvin yleisesti käytetty väriaine, joka fluoresoi aallonpituudella 494-518 nm. Muita aallonpituusalueita on esimerkiksi HEX-leimalla (aallonpituusalue 535-556 nm) [ATDBio Ltd. 2005-2017]. Vähemmän käytetty Cy5-leima fluoresoi sen sijaan parhaiten aallonpituudella 633 nm tai 647 nm [Thermo Fisher Scientific, 2017].

2.2.1 Multiplex-PCR

Multiplex polymeraasiketjureaktion tarkoituksena on monistaa samanaikaisesti useita erilaisia DNA-sekvenssejä. Sama analyysi olisi mahdollista tehdä myös useammalla singleplex PCR-reaktiolla, mutta multiplex PCR:llä säästetään aikaa ja reagensseja, kun PCR tehdään yhdellä reaktiolla. Multiplex PCR:ssä käytetään jokaiselle halutulle tuotteelle omia alukkeita, jotka eivät saa sitoutua toisiinsa. Alukkeilla tulee kuitenkin olla tarpeeksi samanlaiset sulamislämpötilat, joka mahdollistaa saman PCR-ohjelman käytön. [Ashshi, Cooper, Elnifro & Klapper 2000.]

Mikäli tuloksia analysoidaan geelielektroforeesilla, tulee multiplex-PCR:ää suunnitellessa ottaa huomioon, etteivät lopputuotteet saa olla liian samankokoisia. Toinen amplikonien erottelumenetelmä perustuu eri aallonpituuksilla fluoresoivien väriaineiden käyttöön. Väriaine on yleensä kohde-DNA:han kiinnittyvässä koettimessa. Multiplex PCR:ssä, kuten monissa muunlaisissakin PCR-protokollissa, käytetään yleensä hot start -polymeraasia, joka vaatii erillisen lämpöaktivaation. [Ashshi ym. 2000].

Multiplex PCR:ää hyödynnetään lukuisissa sovelluksissa, kuten muun muassa taudinaiheuttajien tunnistuksessa ja DNA-analyyseissä. Sillä voidaan myös tunnistaa geenivirheitä ja virusinfektioita. [Edwards & Gibbs, 1994.]

2.3 *Staphylococcus*-bakteerit

Stafylokokit ovat grampositiivisia bakteereita, jotka kuuluvat ihmisten ja monien eläinten normaalimikrobistoon. Stafylokokkilajeja tunnetaan yli 40 erilaista, joista vain osa on mahdollisia taudinaiheuttajia. Mikroskopoidessa stafylokokit esiintyvät useimmiten ryhminä, minkä avulla ne ovat helpoimmin erotettavissa ketjuja muodostavista streptokokeista. Ne myös tuottavat katalaasientsyymiä. Laboratoriossa stafylokokit testataan yleensä ensimmäisenä koagulaasitestillä – koagulaasiposiitiviset stafylokokit ovat useimmiten patogeenisiä. Useimmat patogeeniset stafylokokit aiheuttavat iho- ja pehmytosainfektioita. [Daniel, 1998, 328]. Ne kestävät korkeita suolapitoisuuksia, ja lähes kaikki stafylokokit voivat kasvaa sekä hapellisissa että hapettomissa olosuhteissa [Eviran julkaisuja, 01/2010].

2.3.1 *Staphylococcus pseudintermedius*

Staphylococcus pseudintermedius on lemmikkieläimillä, erityisesti koirilla, esiintyvä koagulaasiposiitiviisiin stafylokokkeihin kuuluva bakteeri. Opportunistisena taudinaiheuttajana se voi aiheuttaa infektioita koirilla ja kissoilla muun muassa iholla, korvissa, haavoissa ja muissa kudoksissa. *S. pseudintermedius* tunnustettiin omaksi lajikseen *S. intermediuksesta* vasta vuonna 2005 [Sasaki ym. 2007].

2.3.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus on koagulaasiposiitivinen bakteeri. Se on yleinen ihmisten iholla sekä nenän ja suun limakalvoilla, ja voi kasvaa poikkeuksellisenkin kuivassa ympäristössä ja laajalla pH- ja lämpötila-alueella. Monet iho- ja pehmytosatulehdukset voivat olla *S. aureuksen* aiheuttamia, ja se onkin ihmisillä yleisin leikkauksen jälkeisten sairaalainfektioiden aiheuttaja. *S. aureus* voi aiheuttaa myös kivuliaita ruokamyrkytyksiä tuottaessaan lisääntyessään enterotoksiineja, joita se voi tuottaa yhtä tai useampaa eri toksiinityyppejä. [Evira julkaisuja 01/2010]. *S. aureuksen* aiheuttamia ihoinfektioita ovat muun muassa märkärupi ja vastasyntyneen pemfigus [Lim Daniel 1998, 526]. Koirilla *S. aureus* on huomattavasti harvinaisempi kuin ihmisellä, mutta se aiheuttaa eläimillä samanlaisia infektioita kuin *S. pseudintermedius* [Boost, O'Donoghue, James, 2007].

2.3.3 Metisilliiniresistentit stafylokokit

MRS- eli metisilliinille resistentit stafylokokit ovat antibioottiresistenttejä bakteerikantoja. Näistä MRSA ja MRSP ovat lyhenteitä metisilliinille resistenteistä *S. aureus*- ja *S. pseudintermedius* -bakteereista. Metisilliini-antibioottia on ennen käytetty stafylokokki-bakteerien aiheuttamien tulehdusten hoitamiseen, minkä takia ne ovat kehittäneet sille vastustuskyvyn eli resistenssin. MRSP/A-kannat ovat usein moniresistenttejä, minkä takia niiden aiheuttamien tulehdusten hoito on vaikeampaa verrattuna herkkiin kantoihin. Ne voivat aiheuttaa vaikeita sairaalainfektioepidemioita. [Himsworth, Patrick, Parsons, Feng & Weese, 2013]. Suomessa MRSA:n pääasiallinen leviämispaiikka onkin useimmiten sairaaloissa. MRSA-infektiot ovat ihmisillä melko yleisiä. Sen kantajat ovat yleensä lyhytaikaisia kantajia, joka on pitkäaikaista kantajuutta huomattavasti yleisempää. [Lumio, 2016].

MRSA on pääsääntöisesti ongelma ihmisillä, kun eläimillä infektiot ovat verrattain harvinaisia. MRSA:ta on kuitenkin esiintynyt eläimillä mm. nautojen utaretulehduksissa, ja se voi olla zoonoosi eli levitä eläimestä ihmiseen. [Boost, James & O'Donoghue, 2007]. Lemmikkieläinten, erityisesti koirien, ongelmana on vastaavasti MRSP. MRSP-tartunta on ihmisellä harvinainen. Mahdollisuus MRSP:n leviämiseen ihmiseen eläimestä on olemassa, mutta tapauksia on vain harvassa, sillä ihminen ei luontaisesti kannata edes herkkää kantaa *S. pseudintermediuksesta*. [van Duijkeren ym, 2011].

Laboratoriossa MRSA:n ja MRSP:n metisilliiniresistenssiä tutkitaan herkkyysmäärittelyllä, jossa käytetään metisilliinin tilalla yleensä oksasilliinia MRSP:llä tai kefoksitiinia MRSA:lla, sillä niillä löydetään resistentit kanat metisilliiniä paremmin. [Weese & van Duijkeren, 2010]. Mikäli tutkittava kanta on tälle antibiootille resistentti, on sitä syytä epäillä MRS-kannaksi.

Metisilliinille resistenttien bakteerikantojen kromosomissa on yleensä *mecA*-geeni, joka koodaa muuntunutta penisilliiniä sitovaa proteiinia, PBP2a:ta (penicillin binding protein 2a). Beetalaktaamiantibiooteilla, kuten penisilliinijohdannaisilla, on alhainen affiniteetti PBP2a:lle, jolloin antibiootin toiminta estyy ja bakteeri pääsee monistumaan normaalisti. Geeni tekee bakteerista siis resistentin näille antibiooteille. Saman aiheuttaa myös geeni *mecC*, mikä on aiheuttanut diagnostisia ongelmia MRS-kantojen tunnistamis-

sa, kun bakteereista on etsitty vain *mecA*-geeniä. *mecC* on tunnistettu vasta *mecA*:ta myöhemmin, ja sen aiheuttamia MRS-tapauksia on todettu vähemmän. Stafylokokin, jonka kromosomissa on *mecC*-geeni, tunnistaminen MRS-bakteeriksi on huomattavasti *mecA*:ta haastavampaa myös siksi, että olemassa olevat menetelmät *mecA*:n tunnistamiseen antavat herkästi vääriä negatiivisia tuloksia *mecC* MRS-kannosta. *mecC*:n tunnistamisen jälkeen vanhoja PCR-tunnistusmenetelmiä on muokattu joko vaihtamalla aluke sellaiseen, joka monistaa molemmat geenit, tai lisäämällä *mecC*-spesifinen aluke. [Paterson, Harrison & Holmes, 2014].

2.3.4 MRS-bakteerin toteaminen koiralla

MRSP:n ja MRSA:n tunnistamiseksi koirilta otetaan sivelynäytteet suusta ja sieraimesta sekä perianaalialueen limakalvolta. Lisäksi voidaan ottaa kolmas näyte haavasta tai ihorikoista, mikäli niitä on.

Elatusaineessa säilytettävät näytetikut katkaistaan rikastusliemeen, joka on suolapitoisuudeltaan 7 %. Rikastuslientä kasvatetaan yön yli, jonka jälkeen liemestä tehdään viljely selektiiviselle maljalle. Maljalla myöhemmin mahdollisesti kasvava bakteeri tunnistetaan lajitasolle joko biokemiallisesti tai Maldi-tof-menetelmällä. Bakteerista tehdään herkkyysmääritys, ja mikäli sen tulos viittaa MRSA/P-bakteeriin, varmistetaan *mecA/C*-geenin olemassaolo PCR-menetelmällä. [Grönthal ym, 2015].

3 Menetelmät ja materiaalit

3.1 DNA-eristysmenetelmät

Tässä projektissa käytössä oli alkuperäinen DNA-eristyksen referenssimenetelmä, jolla eristyskiä on tehty aikaisemmin. Tätä menetelmää verrattiin uusiin, yhteensä neljään referenssimenetelmästä poikkeaviin ja rikastusliemelle sopiviin DNA-eristysmenetelmiin. Menetelmistä neljä, mukaan luettuna alkuperäinen, tehtiin käsin. Lisäksi yksi menetelmä suoritettiin eristysautomaatilla. Eristetty DNA säilytettiin putkissa -20 °C:ssa.

3.1.1 Manuaaliset menetelmät

Kaikissa tässä projektissa käytetyissä käsin tehtävissä DNA-eristyksissä käytettiin Bio-Rad Instagene Matrix -matriksia. Ensimmäisenä menetelmänä (Menetelmä 1, M1) toimi aiemmin käytössä ollut referenssimenetelmä. Menetelmässä sentrifugoitiin 2 ml hyvin sekoitettua bakteeria rikasteliemessä, joka oli kasvanut yön yli +36 °C:ssa. Tämän jälkeen supernatantti poistettiin ja solunappi resuspensoitiin 10 ml:aan 1x PBS-puskuria. Liuos sentrifugoitiin (3000 rpm, 10 min) ja resuspensoitiin 400 µl:aan InstaGene Matrixia (Bio-Rad), minkä jälkeen sitä vorteksoitiin 15 sekuntia ja inkuboitiin 56 °C:ssa yksi tunti. Inkuboinnin jälkeen se vorteksoitiin uudelleen, ja inkuboitiin toinen tunti 95 °C:ssa. Viimeisen inkuboinnin jälkeen sitä vielä vorteksoitiin ja sentrifugoitiin 13200 rpm:ssä viisi minuuttia.

Toisena menetelmänä (Menetelmä 2, M2), eli varsinaisena ensimmäisenä testimenetelmä käytettiin referenssimenetelmän kaltaista eristystä ilman pesua PBS-puskurilla. Aikaisemmin kaikissa rikasteliemiputkista tehdyissä testauksissa solut oli pesty PBS-puskurilla rikasteliemen korkean suolapitoisuuden (7,5 %) vuoksi, joten tämän menetelmän tarkoitus oli testata pesun tarpeellisuutta käytännössä. Kolmantena menetelmänä (Menetelmä 3, M3) eli toisena testimenetelmänä käytettiin niin sanottua pikamenetelmää, jossa suspensoitiin suoraan rikastelientä suoraan matriksiin. Lisäksi inkubointiaikoja lyhennettiin huomattavasti. Näiden menetelmien lisäksi testauksen aikana kehitettiin menetelmistä 2 ja 3 johdettu menetelmä 4, jotta saataisiin yhdistettyä molempien menetelmien hyviksi osoittautuneet puolet: suuri määrä rikastelientä ja lyhyet inkubointiajat.

Kaikki menetelmät ja niiden vaiheet on esitetty taulukossa 1. Taulukon vaiheiden lisäksi näytteitä vorteksoitiin resuspensoinnin ja inkubointien välissä.

Taulukko 1. Eristysmenetelmien vaiheet

Menetelmä	M1	M2	M3	M4
MRSP/A liemi	2 ml	2 ml	50 µl + 400 µl Matrix	2 ml
Sentrifugointi	3000 rpm, 10 min	3000 rpm, 10 min	ei	3000 rpm, 10 min
Pesu + sentrifugointi	10 ml PBS; 3000 rpm, 10 min	ei	ei	ei
Resuspensointi	400 µl Matrix	400 µl Matrix	ei	400 µl Matrix
1. inkubointi	56 °C, 1 h	56 °C, 1 h	56 °C, 20 min	56 °C, 20 min
2. inkubointi	95 °C, 1 h	95 °C, 1 h	100 °C, 8 min	100 °C, 8 min

3.1.2 Eristysautomaatti

Vaihtoehtoisena menetelmänä testattiin myös testikäyttöön tullutta, Nordiag Arrow -eristysautomaattia. Nordiag Arrow perustuu magneettisten helmien käyttöön DNA:n eristämisessä ja pystyy käsittelemään kerralla 1-12 näytettä noin 40 minuutissa. Eristysautomaatissa käytettiin Bugs'n beads -kittiä [Diasorin, The Diagnostic Specialist, 2013].

Eristysautomaatti saatiin käyttöön vasta hieman myöhemmin, joten täysin rinnakkaisia testauksia ei sillä pystynyt tekemään manuaalisten menetelmien kanssa. Sillä kuitenkin pyrittiin testaamaan samankaltaiset, tunnetut näytteet kuin muillakin menetelmillä. Lisäksi potilasnäytteitä eristäessä käytettiin rinnakkain eristysautomaattia. Testauksia tehtiin myös laimeammilla näytteillä testaten sitä, olisiko näytteiden konsentraatio automaatille liian suuri. Samaan aikaan eristettiin sekä laimentamaton näyte, että 1:2 ja 1:4 MRSA-liemeen laimennetut näytteet. Erään valmistajan ohjeistuksen mukaan Bugs'n Beads -protokolla voisi toimia paremmin TSB-liuoksessa olevilla näytteillä, joten myös sitä testattiin vaihtamalla eluutioliuoksena toiminut matriksi TSB-liuokseen.

3.2 Käytetyt bakteerikannat

Työssä käytettiin kahta erilaista, ennalta analysoitua kantaa sekä *S. aureus*- että *S. pseudintermedius* -bakteereista. Lisäksi käytettiin kantaa *S. epidermis* -bakteerista ne-

gatiivisen tuloksen antavana näytteenä. Käytetyt kannat oli valmiiksi pakastettu, ja ne viljeltiin tuoreiksi testauksia varten. Näitä käytettiin niin reagenssin testauksessa, eristysmenetelmien testauksessa laimennossarjoina, sekä simuloiduissa näytteissä. Kaikki käytetyt kannat on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Käytetyt bakteerikannat

Koodi	Kanta	<i>mecA</i>	<i>mecC</i>
K-8	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43366	x	-
LT-130	<i>Staphylococcus aureus</i> IH 256369/THL	-	x
K-16	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	x	-
P-966	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> (potilaskanta)	x	-
K-10	<i>Staphylococcus epidermis</i> ATCC 14990	-	-

3.3 DNA-konsentraation ja puhtausasteen mitta

NanoDrop-laitteella mitattiin suurin osa eristetyistä DNA-näytteistä. Esimerkiksi eristysautomaatilla eristettyjä näytteitä sekä niitä vastaavia käsin tehtyjä eristyksiä mitattiin NanoDrop-laitteella tarkoituksena vertailla saadun DNA:n puhtautta ja DNA-konsentraatiota.

Näytteissä mahdollisesti olevat proteiinit (suhdeluku alle 1,8) ovat rikasteliemistä tehdyissä DNA-eristyksissä luultavasti peräisin liemestä, jossa on tässä tapauksessa muun muassa paljon proteiineja sisältäviä tryptonia ja soijaa. Mittauksia ei tehty kaikista eristyksistä niiden samankaltaisuuden vuoksi, mutta etenkin toisiinsa hyvin vertailukelpoiset näytteet mitattiin.

3.4 PCR-ajot

3.4.1 Alukkeet ja koettimet

Alukkeina käytettiin *S. aureukselle*, *S. pseudintermediukselle* sekä *mecA*- ja *mecC*-geeneille spesifejä alukkeita. Koettimina käytettiin fluorensioivilla aineilla leimattuja koettimia. Jokaiselle tutkittavalle geenille oli oma koettimensa. Alukkeet ja koettimet on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Tutkimuksessa käytetyt forward (F)- ja reverse (R) -alukkeet sekä leimatut koettimet.

Kohde	Nimi	Koetin	5'-leima
<i>S. aureus nuc</i>	<i>nucSA_F</i>	<i>nucSA_TR</i>	Texas Red
	<i>nucSA_R</i>		
<i>S. pseudintermedius nuc</i>	<i>nucSP_F</i>	<i>nucSP_HEX</i>	HEX
	<i>nucSP_R</i>		
<i>mecA</i>	<i>mecAP_F</i>	<i>mecAP_FAM</i>	FAM
	<i>mecAP_R</i>		
<i>mecC</i>	<i>mecCP_F</i>	<i>mecCP_Cy5</i>	Cy5
	<i>mecCP_R</i>		

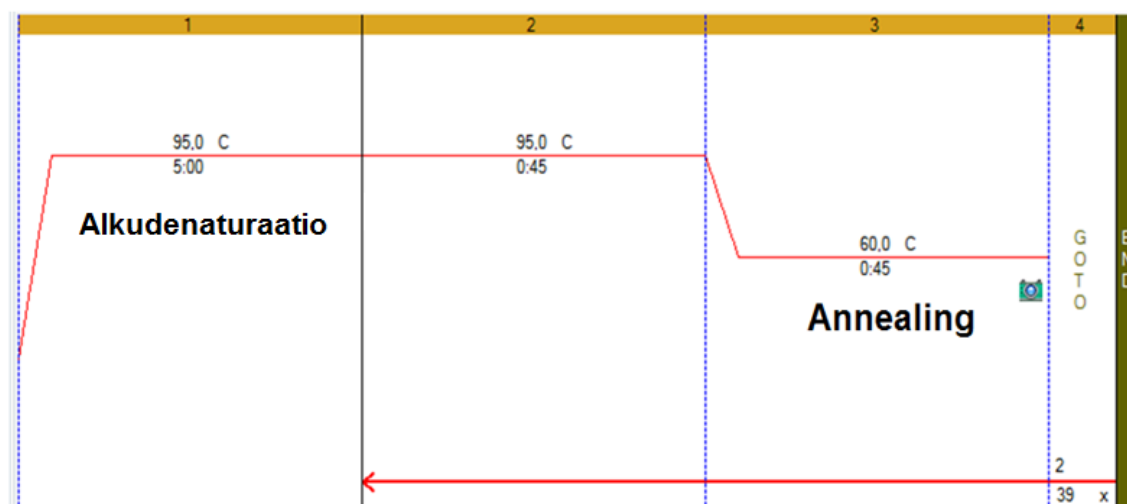
Alukkeiden ja koettimien pipetointi PCR:n tekemiseen suoritettiin erikseen määrättyssä, PCR-puhtaassa tilassa. Pipetointivaraa jätettiin 10 % pipetoimisen mahdollistamiseksi, joka on aiemmin todettu ja todettiin nytkin toimivaksi. Kaikissa PCR-ajoissa käytettiin samoja alukkeita ja koettimia samoilla konsentraatioilla (Taulukko 4).

Taulukko 4. Alukkeiden ja koettimien pipetointimäärät

	Määrä/reaktio (μl)	Loppukonsentraatio (μM)
2x HotStart Master Mix	12,5	1
<i>nucSA_F</i>	1,25	0,49
<i>nucSA_R</i>	1,25	0,49
<i>nucSA_TR</i>	0,5	0,2
<i>nucSP_F</i>	1,25	0,49
<i>nucSP_R</i>	1,25	0,49
<i>nucSP_HEX</i>	0,5	0,2
<i>mecAP_F</i>	1,25	0,49
<i>mecAP_R</i>	1,25	0,49
<i>mecAP_FAM</i>	0,5	0,2
<i>mecCP_F</i>	1,25	0,49
<i>mecCP_R</i>	1,25	0,49
<i>mecCP_Cy5</i>	0,5	0,2
Templaatti	1	
Yhteensä:	25,5	

3.4.2 PCR-protokolla

PCR-ohjelmana käytettiin kuviossa 1 esitettyä lämpötilaohjelmaa. Käytettäessä Hots-tart-polymeraasia, oli käytössä pitkä alkudenaturaatioaika. Denaturaatiolämpötilana käytettiin vakiolämpötilaa (95 °C). Annealing-lämpötila oli 60 °C ja syklejä oli yhteensä 40.



Kuvio 1. Käytetty PCR- lämpötilaohjelma

Ennen varsinaisen testauksen aloittamista PCR-protokollan, alukkeiden ja ennen kaikkea spesifisten koettimien toimivuus testattiin kontrollikantojen avulla. Testauksessa käytettiin toimivaksi todettua referenssimenetelmää DNA-eristykseen. Kontrolleina käytettiin kantoja LT-130 (MRSA, mecC), P-966 (MRSP, mecA) ja K-8 (MRSA, mecA). Negatiivisena kontrollia oli PCR-laatuinen vesi.

3.5 Työn toteutus

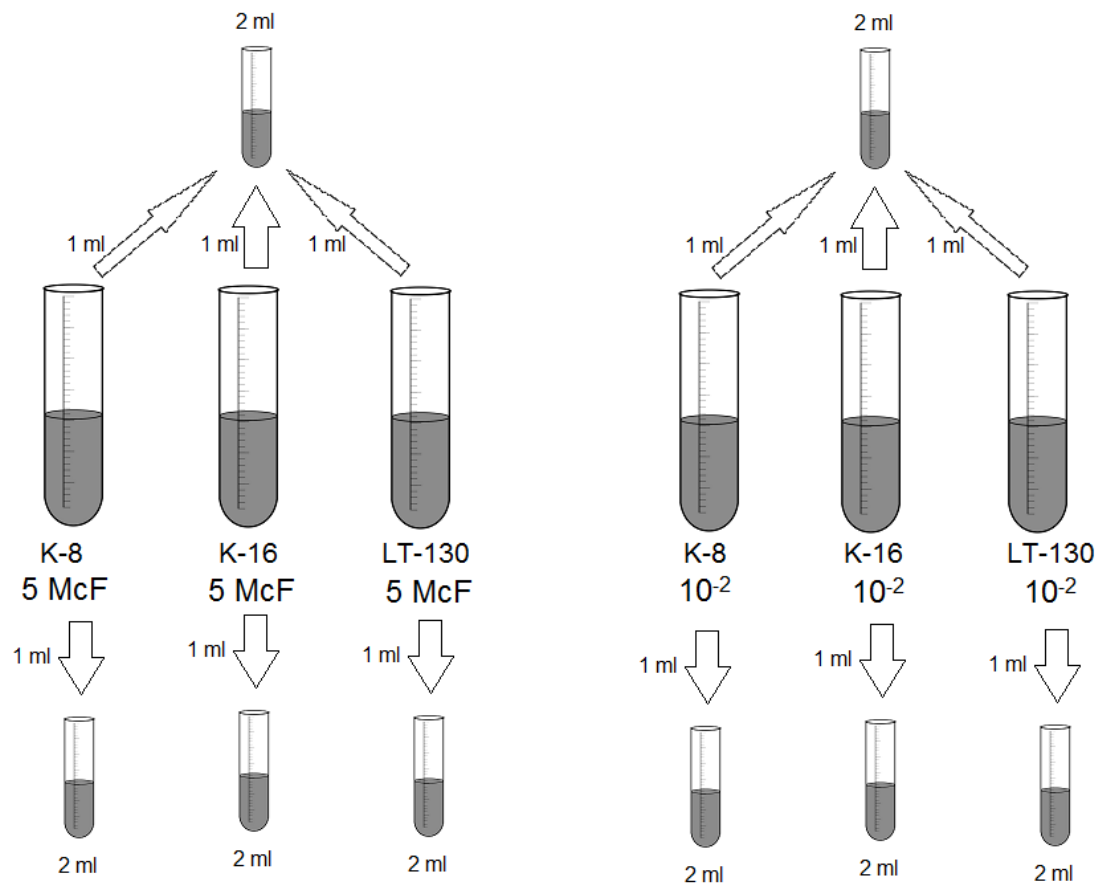
Kaikkia vaihtoehtoisia eristysmenetelmiä testattiin ensin tekemällä eristetystä DNA:sta samanlaiset multiplex qPCR-ajot. Testaukset aloitettiin kolmella MRSA-rikasteliemessä rikastetulla kannalla, K-8, K-16 ja LT-130 (Taulukko 1), joista tehtiin laimennossarjat 10^{-1} - 10^{-9} . Näistä laimennoksista eristettiin DNA ensin alkuperäisellä, käytössä olevalla menetelmällä (M1) ja sen jälkeen kahdella testattavalla menetelmällä (M2 ja M3). Jo ensimmäistä eristystä tehdessä huomioitiin, ettei laimennoksissa 10^{-6} - 10^{-9} ensimmäisen sentrifugoinnin jälkeen ollut nähtävillä minkäänlaista solunappia, minkä takia eristykset tehtiin lopulta vain laimennoksista 10^{-1} - 10^{-5} . Kolmen testikannan laimennosten lisäksi eristettiin DNA ensimmäisellä kerralla myös negatiivisena kontrollina toimivasta kontrollikannasta K-10. Jatkotesteissä sitä ei enää käytetty.

Yksittäisten kontrollikantojen lisäksi tehtiin rikasteeseen liemi kolmen, aiemmin testattujen kantojen seoksesta ajatuksena testata, kuinka menetelmät reagoivat kaikkien geenien läsnäoloon. Seoksesta tehtiin laimennossarja kuten aiemmin ja kaikista eristettiin

DNA kaikilla kolmella sillä hetkellä testatulla menetelmällä (M1, M2 ja M3). Näistä tehtiin PCR-ajot samaa protokollaa käyttäen. Myöhemmin testattiin samanlaisia seosnäytteitä myös menetelmällä 4 sekä eristysautomaatilla.

Kantojen lisäksi testattiin simuloituja näytteitä. Tarkoituksena oli luoda mahdollisimman realistiset testiolosuhteet testaamalla rikastusliemiä, joissa on kliinisessä näytteessä esiintyviä muita bakteereita. Käytetyt potilasnäytteet otettiin terveistä koirista samalla tavalla kuin aidoistakin riskipotilaista. Ennen potilasnäytteiden käyttöä niiden negatiivisuus varmistettiin sekä viljelemällä ne rikasteliemestä MRSA II -maljalle että tekemällä niistä PCR-ajot. Käyttöön valittiin yksi koira, jonka potilasnäytteistä tehtiin kaikki testatut simuloidut näytteet.

Potilasnäytteet rikastettiin MRSA-rikasteliemessä. Simuloituina näytteinä käytettiin näitä potilasnäytteitä, joihin lisättiin tietty määrä kontrollikantoina toimineita bakteerikantoja. Simuloituja näytteitä valmistettiin yhteensä 17 erilaista. Tehtiin 0,5 McFarlandia oleva liuos aiemminkin käytetyistä kolmesta bakteerikannasta K-8, K-16 ja LT-130, joista tehtiin laimennossarja 10^{-1} - 10^{-5} 0,9 % NaCl:iin. Laimennoksista 10^{-3} - 10^{-5} lisättiin 100 µl näytteeseen. Näistä yhdeksästä näytteistä eristettiin DNA kolmella testattavalla menetelmällä (menetelmät 1, 2 ja 4). Kaikista näytteistä tehtiin myös rinnakkaiset näytteet ja ne kaikki ajettiin multiplex-PCR-ohjelmalla. Laimeiden näytteiden lisäksi tehtiin 5 McFarlandia oleva liuos samoista bakteerikannoista, josta tehtiin myös 10^{-2} laimennos. Näitä molempia kaikista kannoista ympättiin 1 ml näytteeseen. Lisäksi tehtiin näytteet, joista toiseen lisättiin jokaisen kannan 5 McF laimennoksesta 1 ml ja toiseen 10^{-2} laimennoksesta vastaavasti 1 ml kuvion 2 mukaisesti. Näyteliuosta putkissa oli ennestään menetelmän vaatima 2 ml. Kaikista kahdeksasta erilaisesta näytteestä tehtiin myös rinnakkaiset näytteet. Nämä eristettiin kahdella manuaalisella menetelmällä (menetelmät 2 ja 4) sekä eristysautomaatilla. Nämä näytteet tehtiin selvittämään sekä DNA-eristysmenetelmien että PCR-menetelmän herkkyyttä.



Kuvio 2. Ympattujen näytteiden valmistus

3.6 Kliiniset potilasnäytteet

Kliinisten potilasnäytteiden testauksia varten valittiin mahdollisimman tuoreita näytteitä viljelymenetelmällä niin MRSP-positiiviksi kuin -negatiivisiksikin todetuista potilaista. Näytteet olivat peräisin eläinsairaalle muutenkin testattaviksi tulleista riskipotilaista, pelkästään koirista. Multiplex-PCR:llä saatuja tuloksia verrattiin perinteisellä maljame-
netelmällä sekä yksinkertaisella PCR:llä laboratoriossa aikaisemmin saatuihin tuloksiin. Kliinisten potilasnäytteiden testaus uudella menetelmällä kertoo menetelmän luotetta-
vuudesta, kun tuloksia verrataan laboratoriossa käytössä olevalla, validoidulla mene-
telmällä saatuihin tuloksiin.

3.7 Kustannusten ja ajankäytön vertailu

Eristysmenetelmiä vertaillessa tuli ottaa huomioon paitsi menetelmien toimivuus ja herkkyys, myös niiden hinta laboratoriolle sekä niiden tekemiseen kuluva aika. Mitä vähemmän aikaa menetelmä kuluttaa, sitä nopeammin tulokset saadaan eteenpäin ja sitä enemmän aikaa jää muuhun työskentelyyn. Parasta menetelmää valittaessa pyrittiin etsimään näiden kaikkien ominaisuuksien tasapainoa.

Kuluihin otettiin huomioon mahdollisten reagenssien ja käytettävien tarvikkeiden sekä kaupallisten kittien hinta-arviot. PCR-ajossa käytettäviä reagenssikuluja, joihin kuuluu alukkeet, koettimeet ja entsyymi, ei otettu huomioon, sillä reagenssimäärät ja ajo ovat samat eristysmenetelmästä riippumatta. Lisäksi arvioitiin keskimääräinen ajankäyttö jokaisen menetelmän osalta. Huomioitiin myös odotusajat niin, että esimerkiksi pitkän inkuboinnin aikana työntekijä ehtii tekemään välissä muita töitä, mutta itse tulos on myöhemmin valmis.

4 Tulokset ja tulosten tarkastelu

4.1 Eristysmenetelmien vertailu

4.1.1 DNA-konsentraatio ja puhtausaste

Mittaustulosten perusteella kaikissa menetelmän 1 eristyksissä DNA:n saanto oli huomattavasti pienempi verrattuna ilman PBS-pesua tehtyyn eristysmenetelmään 2 (taulukko 5). NanoDrop pystyi luotettavasti mittaamaan vain vahvimman näistä laimennoksista, eli alkuperäisellä menetelmällä DNA-konsentraatio jäi alle 3 ng/μl jo laimennoksessa 10⁻². Menetelmällä 1 oli kuitenkin paras puhtausaste, joskin otanta on liian laimeiden näytteiden takia hyvin pieni. Kaikki mittaustulokset on esitetty Liitteessä 1. Liian laimeita NanoDropille olivat luultavasti myös kaikki menetelmällä 3 eristetyt näytteet, sillä se antoi niille kaikille laimennoksesta riippumatta samansuuntaisen lukuarvon. Tämä arvo oli väliltä 81,2-99,6 ng/μ, mikä kertoo luultavasti siitä, että suoraan liemestä tehdyn menetelmän eristykseen jäänyt MRSA-rikastusliemi absorboi mitatuilla aallonpituuksilla. Menetelmällä 3 saatu DNA ei siis ollut puhdasta ja saanto oli pieni. Tämä ei

ollut yllättävää, sillä kahdessa muussa testatussa menetelmässä lähtömateriaalia oli 2 ml, kun menetelmässä 3 oli vain 50 µl.

Kun uusi menetelmä (Menetelmä 4, M4) otettiin mukaan testauksiin, huomattiin sillä eristettyjen näytteiden DNA-konsentraation olevan hieman menetelmää 2 pienempi, mutta ei merkittävästi, ja silti huomattavasti kahta muuta testattua menetelmää korkeampi. Tämä toistui lähes kaikissa NanoDropilla mitatuissa näytteissä (Taulukko 5). Laimennossarjassa oli suurempaa eroavaisuutta ja lineaarisuutta menetelmän 3 tuloksiin verrattuna. Eristysautomaatilla eristettyjen DNA-näytteiden mittauksia verrattiin menetelmän 4 mittaustuloksiin huomaten, ettei niiden DNA-konsentraatio ollut yhtä suuri kuin menetelmällä 4. Myös puhtausasteet olivat matalammat. TSB:hen suspensoidut näytteet antoivat myös alhaisempia konsentraatiopitoisuuksia, mutta niiden puhtaus oli samaa luokkaa menetelmällä 4 mitattuihin puhtausasteisiin. Eristysautomaatilla eristettyjen näytteiden mittaukset ja vertailutulokset on esitetty Liitteessä 2.

Taulukko 5. Eri menetelmillä saatujen DNA-näytteiden puhtaus- ja konsentraatioarvojen vertailu.

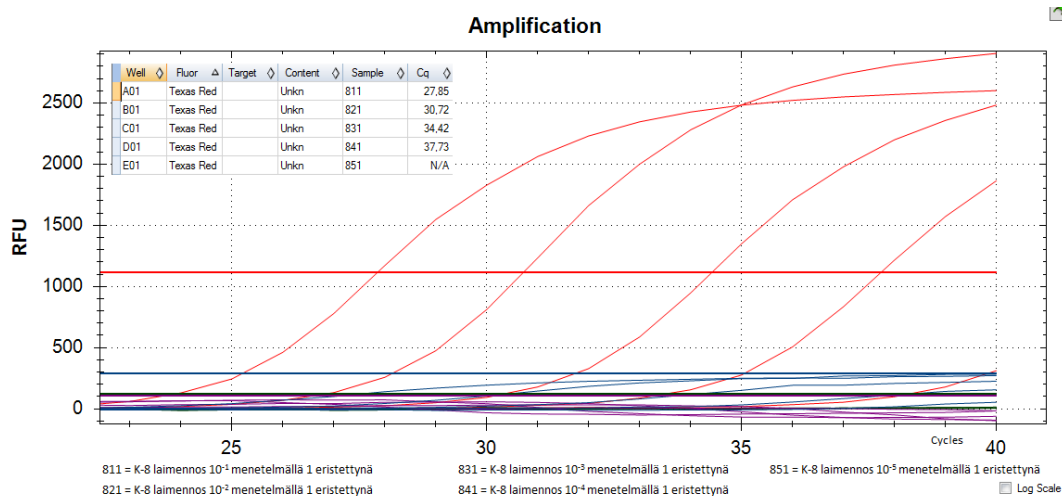
Menetelmä			M1	M2	M3	M4
Näyte*	K-8	[DNA] ng/µl	16,9	106,2	86,4	71,5
		A (260/280)	2,030	1,360	1,191	1,307
	K-16	[DNA] ng/µl	9,7	125,0	86,2	86,3
		A (260/280)	2,0	1,303	1,177	1,252
	LT-130	[DNA] ng/µl	19,2	118,7	85,8	82,0
		A (260/280)	2,182	1,371	1,196	1,303
	Seos (K-8+ K-16+LT-130)	[DNA] ng/µl	14,5	105,6	93,6	-
		A (260/280)	2,124	1,342	1,204	-
	K-10	[DNA] ng/µl	149,2	420	87,7	-
		A (260/280)	2,298	1,994	1,239	-

*näytteenä suspensio, jossa bakteerikantaa tai kantojen seosta oli kasvatettu yli yön MRSP/A-rikasteliemessä. Tässä taulukossa tulokset ovat ko. suspension 10⁻¹ laimennoksista.

NanoDropin antamien, osittain ristiriitaisten tulosten vuoksi nollanäytteenä kokeiltiin matriksin lisäksi käyttää myös vettä ja MRSA-liuosta, mutta ne eivät vaikuttaneet tuloksiin.

4.1.2 Menetelmien PCR-tulokset

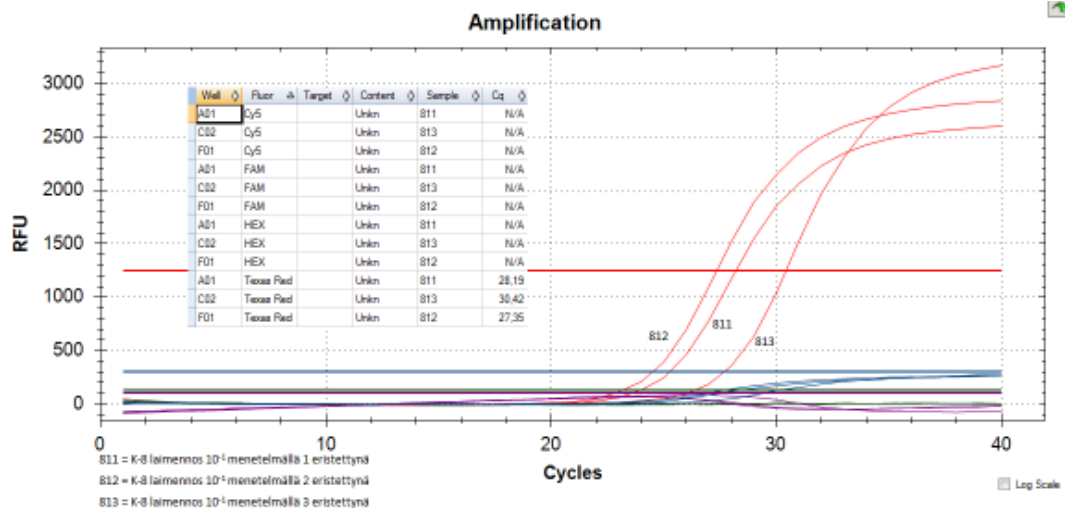
Käytössä olevan menetelmän (M1) ja PCR-protokollan testaus kontrollikannoilla onnistui kaikin puolin hyvin: koettimet toimivat kuten oli odotettu ja laimeammat näytteet monistuiivat myöhemmillä sykleillä, kuten kuuluukin (Liite 3). Mitä korkeampi DNA-konsentraatio näytteellä on, sen aikaisemalla syklillä näytteen käyrä tuli PCR-tuloksissa. M1 ja M3 -menetelmillä 10^{-5} -laimennos tuntui kuitenkin olevan jo liian laimea, sillä se ei ehtinyt monessa näytteessä monistua lähes lainkaan 40 syklin aikana. Kaikilla menetelmillä tehtyjen laimennossarjojen PCR-tulokset olivat lineaariset ja niiden etäisyys toisiinsa samanpituinen laimennosten kesken (Kuvio 3). Sykliä määrä oli myös looginen laimennosten välillä: 3,3 sykliä aikaisemmin tullut käyrä kertoo kymmenkertaisesta DNA:n määrästä.



Kuvio 3. Kontrollikannan K-8 laimennossarja eristettynä menetelmällä 1 (*S. aureus*/Texas Red)

Menetelmällä 2 tehdyt eristykset monistuivat kaikissa näytteissä ensimmäisenä PCR-reaktiossa. Tulosten mukaan menetelmässä 1 käytetty pesu PBS-puskurilla vähensi DNA:ta melko rajusti näytteen laimenemisen ja käsin tehdyn resuspensoinnin takia. Menetelmällä 2 ilman pesua eristetty, hieman epäpuhtaampi DNA ei näyttänyt haittaa-

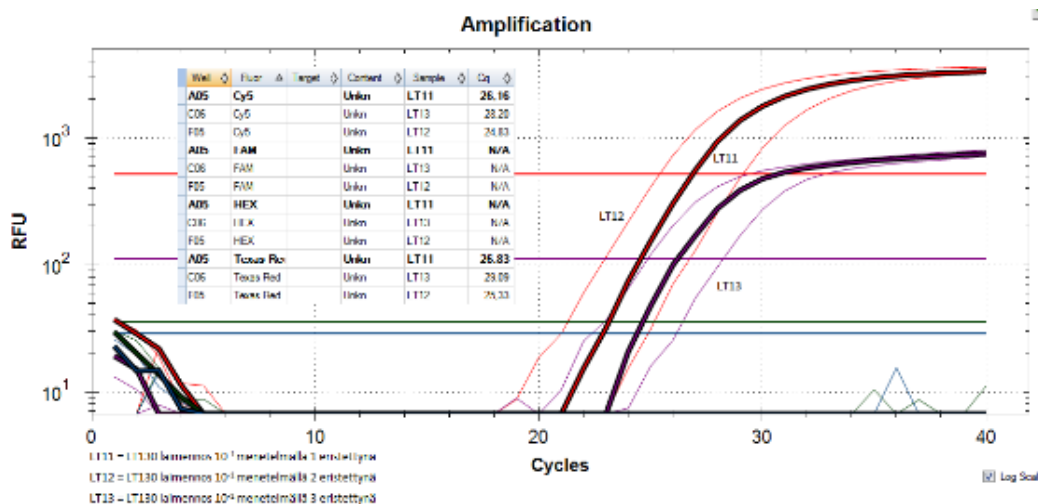
van PCR-protokollaa (Kuvio 4). Tämä oli nähtävillä lähes kaikissa tuloksissa. Pikamene-
telmällä 3 eristetty näyte monistui PCR-reaktiossa muiden menetelmien käyriin ver-
rattuna myöhäisessä vaiheessa (Kuvio 4). Tämä johtuu todennäköisesti DNA:n vähäi-
sestä kopiomäärästä tai inhiboivista tekijöistä reaktiossa. Tulokset toistuivat kaikilla
testinäytteillä.



Kuvio 4. Kontrollikanta K-8 eristettynä menetelmillä 1, 2 ja 3 (*S. aureus*/Texas Red).

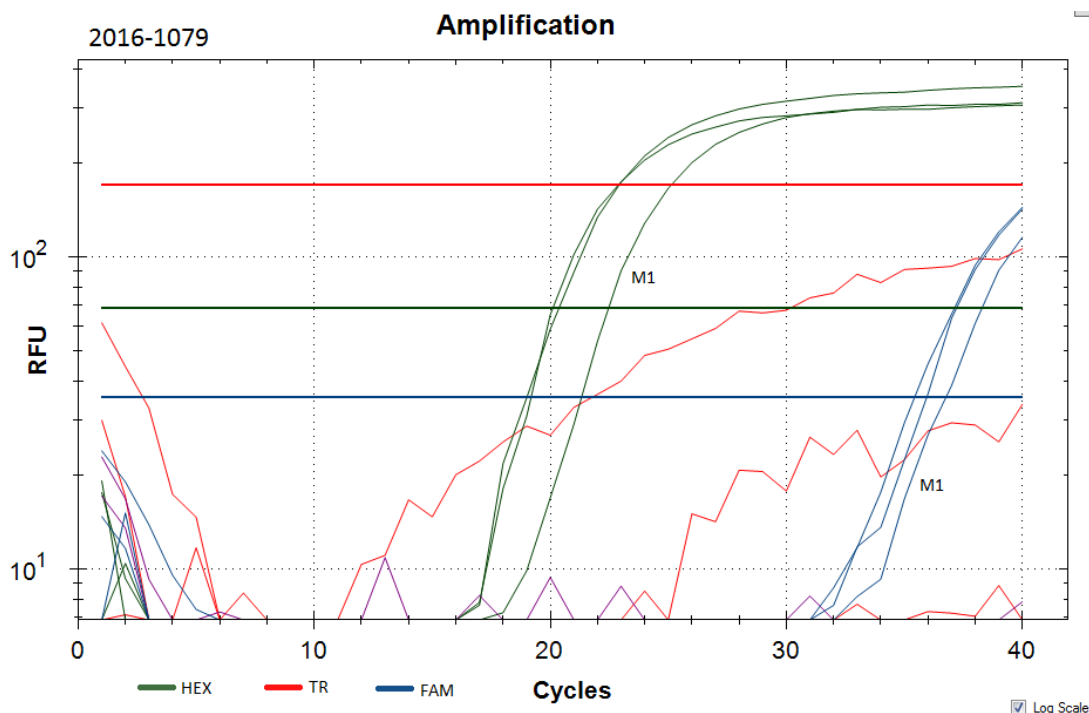
Myös seosnäytteillä (näytteet, missä oli kaikkia käytettyjä kontrollikantoja) tehdyt tes-
tieristykset ja -ajot onnistuivat toivotusti. Vain kaikkein laimeimmissa näytteissä DNA-
konsentraatio oli liian alhainen 40 syklin PCR-protokollalle, eikä monistumista tulosten
perusteella tapahtunut. Sama oli nähtävillä myös yksittäisten kontrollikantojen eristyk-
sissä.

DNA:n matala pitoisuus menetelmällä 3 tehtävissä eristyksissä oli nähtävissä myös
NanoDropilla mitatussa konsentraatioarvossa (Liite 1). Korkeammat Cq-arvot antavat
PCR-tulokset myös toistivat itseään näytteestä riippumatta (Kuvio 5). Tästä johtuen
testejä ei jatkettu kyseisellä menetelmällä enää lainkaan kahden näytesarjan PCR-ajon
jälkeen.



Kuvio 5. Laaduntarkkailukannan LT-130 PCR-tulokset eristettynä menetelmillä 1 (tummennetut), 2 (alhaisin Cq-arvo) ja 3 (korkein Cq-arvo).

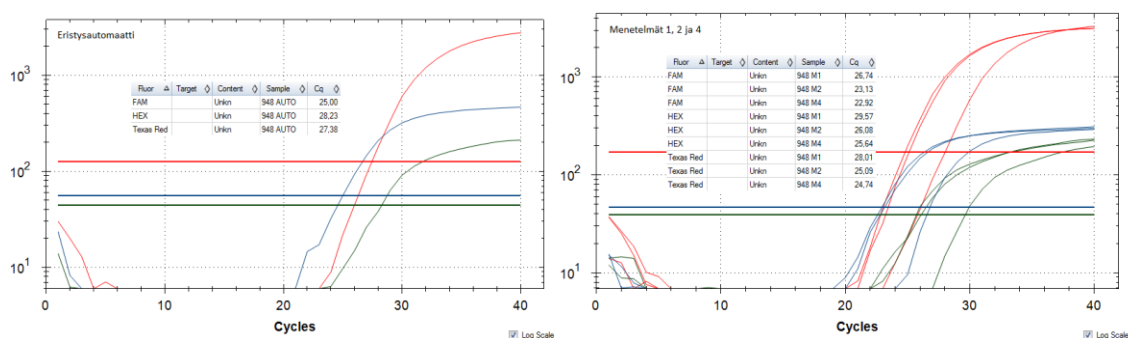
Myös menetelmällä 4 eristettiin DNA samojen näytteiden laimennossarjoista. Menetelmä tuntui eristävän DNA:n riittävän hyvin antaen alhaisia Cq-arvoja, eikä sillä eristetyn DNA:n konsentraatio ollut menetelmällä 2 eristettyä alhaisempi (Kuvio 6).



Kuvio 6. Erään aiemmin negatiiviseksi tutkitun potilasnäytteen PCR-tulokset menetelmillä 2, 4 ja 1. Texas Red on noussut HEX-väriin suuresta intensiteetistä johtuneesta artefaktasta. Monistunut FAM (*mecA*) on todennäköisesti peräisin koagulaasinegatiivisesta stafylokokista.

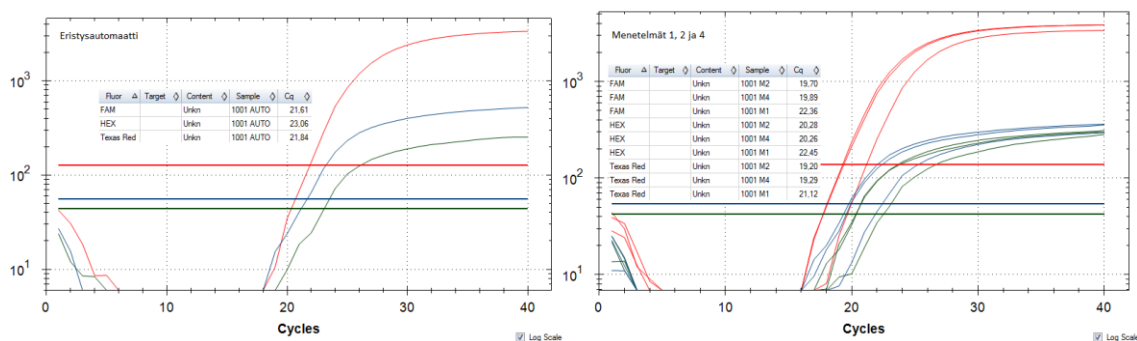
4.1.3 Eristysautomaatin PCR-tulokset

Koekäyttöön tullutta eristysautomaattia vertailtiin käsin tehtäviin menetelmiin. Pääsääntöisesti sillä eristettyjen näytteiden käyrät tulivat PCR-tuloksissa suurin piirtein samoilla sykleillä menetelmien 2 ja 4 kanssa (Kuvio 7).



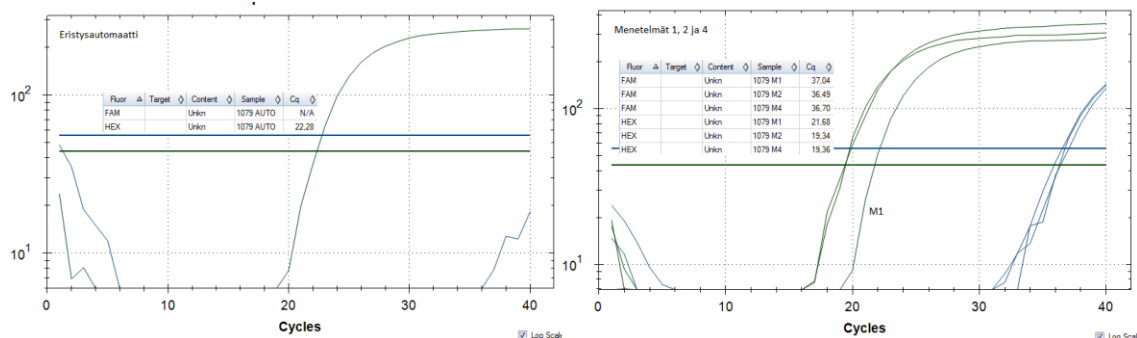
Kuvio 7. Eräs potilasnäyte eristettynä eristysautomaatilla (vasemmalla) sekä menetelmillä 1, 2 ja 4 (oikealla).

Eristysautomaatilla eristetyt näytteet tulivat kuitenkin osassa PCR-ajoissa jopa myöhemmin kuin menetelmillä 2 ja 4 eristetyt vastaavat näytteet (Kuvio 8). Jotkut näytteet monistuivat myös alhaisemmillä Cq-arvoilla, mutta näitä oli korkeampia arvoja antavia näytteitä vähemmän.



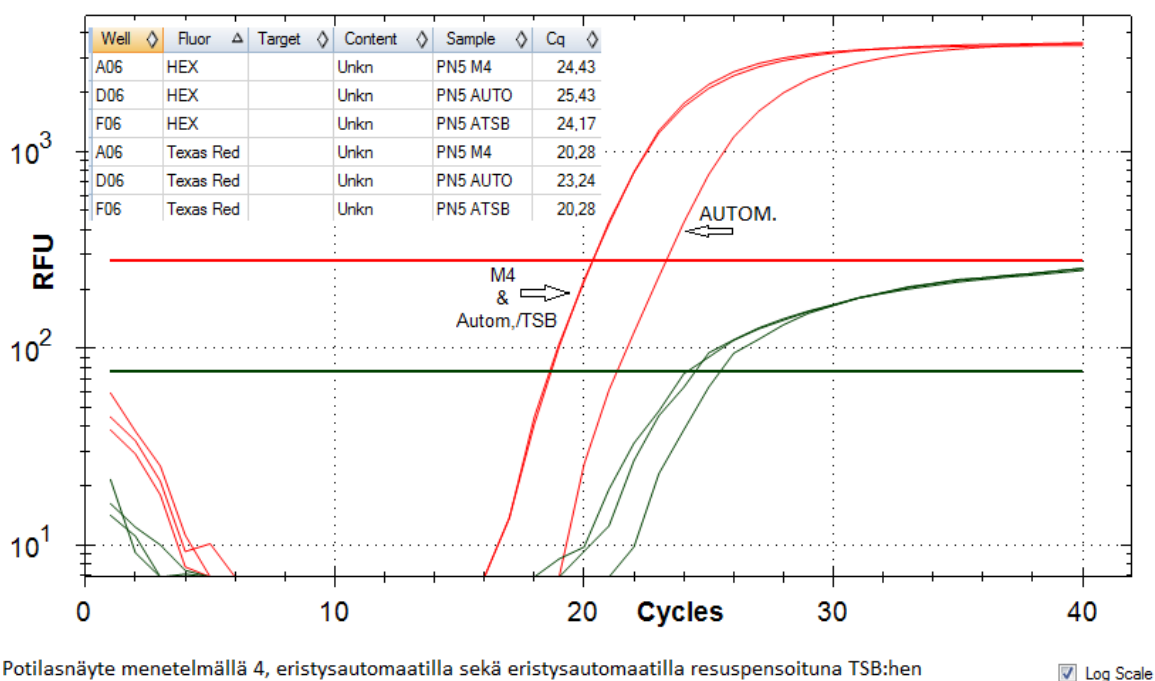
Kuvio 8. Eräs potilasnäyte eristettynä eristysautomaatilla (vasemmalla) sekä menetelmillä 1, 2 ja 4 (oikealla). Eristysautomaatilla FAM tulee vasta syklillä 21,6, kun taas menetelmillä 2 ja 4 alle 20:llä.

Yhden näytteen *mecA*:n aluke ei ehtinyt monistua tarpeeksi jättäen sen väriaineen (FAM) fluoresenssin kuvaajasta lähes kokonaan pois (Kuvio 9). Tämä johtui näytteen eristysautomaatille liian alhaisesta DNA-konsentraatiosta.



Kuvio 9. Eräs potilasnäyte eristettynä eristysautomaatilla (vasemmalla) ja menetelmillä 1, 2 ja 4 (oikealla). *MecA*:n FAM (kuvassa korkeimman Cq-arvon antava sininen käyrä) jää eristysautomaatilla vajaaksi.

Eristysautomaatin tuloksia yritettiin parantaa myös mittaamalla näyte TSB-liuoksessa. Tämä tuntui PCR-tulosten mukaan parantavan tuloksia jonkin verran niin, että Cq-arvo oli sama, tai jopa alhaisempi, kuin menetelmällä 4 eristettynä (Kuvio 10). Tämä kuitenkin toi näytteen käsittelyyn lisävaiheiksi sekä sentrifugoinnin että resuspensoinnin, jolloin koko eristysautomaatin käyttämisen idea, nopeus ja vaiheiden vähyyys, kärsi huomattavasti.



Kuvio 10. Eräs potilasnäyte eristettynä menetelmällä 4, normaalisti eristysautomaatilla sekä eristysautomaatilla suspensoituna TSB-liuokseen. Automaatilla eristetty näyte on molemmissa käyrissä oikealla, kun taas menetelmällä 4 ja TSB-liuokseen suspensoitu, automaatilla eristetty näyte monistuvat melko samanaikaisesti.

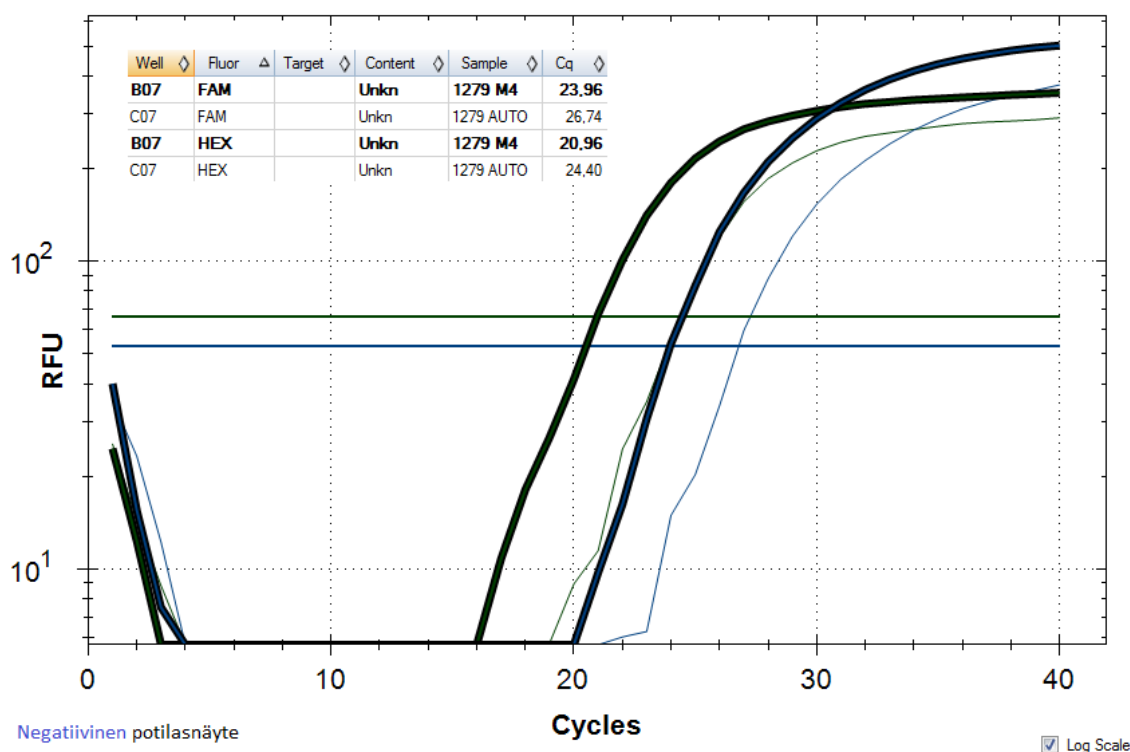
Laimeampia, 1:2 ja 1:4 MRSA-liemessä, näytteitä eristettäessä eristysautomaatilla ei huomattu tuloksissa merkittäviä eroja.

4.2 Simuloidut ja kliiniset potilasnäytteet

Simuloitujen potilasnäytteiden tekoon käytettiin näytteitä yhdestä MRSP-negatiivisesta koirasta, joka PCR:n tuloksien mukaan kantoi vain *S. pseudintermediusta*. Simuloitujen näytteiden PCR-tulosten perusteella potilasnäytteessä ei kuitenkaan enää ollut *S. pseudintermediusta*. Tämä voi johtua eroista näytteenotossa tai koiran mikrobiston muutoksista.

Laimeammilla liuoksilla (0,5 McFarlandia laimennossarjassa 10^{-1} - 10^{-5} , joita lisättiin 100 µl 2 ml:n näytemäärään) simuloitujen potilasnäytteiden tulokset olivat huonosti toistettavissa eikä laimennossarja ollut tulosten mukaan lineaarinen. Bakteerimassan määrä oli näissä näytteissä niin pieni, että se oli voinut hävitä jossain kohtaa työskentelyvaihetta esimerkiksi resuspensoidessa näytettä matriksiin. 5 McF laimennossarjan, joita näytteisiin lisättiin 1 ml, tulokset olivat kuitenkin lineaariset ja kaikilla laimennoksilla MRSP- ja MRSA-kannat olivat PCR-positiivisia.

Tuoreita kliinisiä näytteitä saatiin ajan puitteissa testattavaksi yhteensä 39 koirasta. Kaikissa kliinisissä näytteissä tulos oli pääosin tulkittavissa samaksi kuin laboratoriossa maljamenetelmällä tehdyissä tuloksissa. Maljamenetelmä tunnistaa vain MRS-kannat, ei herkkiä stafylokokkikantoja. Joistakin maljamenetelmällä negatiivisista kliinisistä näytteistä huomioitiin myös myöhäisillä sykleillä tuleva *mecA*-geenin läsnäolo, mikä voisi mahdollisesti joissain tapauksissa tarkoittaa MRSP/A-kantaa, mutta voisi olla peräisin myös koagulaasinegatiivisista stafylokokeista. Maljamenetelmällä negatiiviseksi todettuina tämä oli kuitenkin epätodennäköistä, sillä *mecA* ja *S. pseudintermedius* tulivat PCR:llä sykleissä niin eriaikaisesti (Kuvio 11). Tämä tarkoittaa todennäköisesti sitä, että näytteessä oli jokin toinen *mecA*-geeniä kantava bakteeri.



Kuvio 11. Maljamenetelmällä negatiiviseksi todettu potilasnäyte eristettynä eristysautomaatilla ja menetelmällä 4 (tummennettu). Havaittavissa on *S. pseudintermediukseen* liitettävä HEX sekä *mecA*-geeniin liitettävä FAM, jolloin kyseessä voisi olla MRSP-kanta. Käyrät tulevat kuitenkin hieman eri sykleillä nin, että tulos on myös mahdollisesti luettavissa negatiiviseksi.

Kaikki kliinisistä näytteistä saadut tulokset ovat taulukossa 6. Taulukossa ja laskelmissa positiiviseksi oli tulkittavissa näyte, jonka PCR-tuloksissa *nuc*- ja *mec*-koettimien kierrosten välimatka oli alle 4.

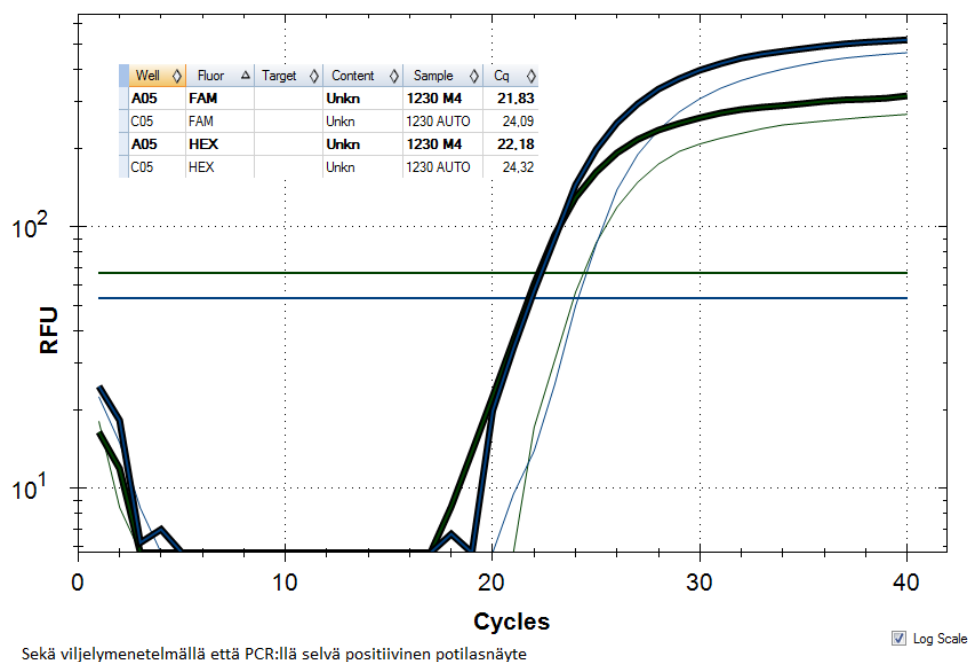
Taulukko 6. Potilasnäytteiden PCR-tulokset ja Ct-arvot. PCR on tehty menetelmällä 4 eristystä DNA:sta. Eroavat tulokset on merkitty punaisella.

Näyte-numero	<i>mecA</i> /FAM	<i>mecC</i> /Cy5	<i>nucSa</i> /TR	<i>nucSp</i> /HEX	pos/neg	<i>mec/nuc</i> -välimatka	Tulkittavissa (PCR:n perusteella)	Malja-menetelmä
877	35,44	-	-	27,5	+	7,94	-	-
916	32,96	-	-	24,08	+	8,88	-	-
960	32,81	-	-	22,45	+	10,36	-	-
964	-	-	-	29,88	-	-	-	-
984	29,31	-	-	-	-	-	-	-
989	-	-	-	28,02	-	-	-	-
1004	29,40	-	-	-	-	-	-	-

1213*	34,48	-	-	30,34	+	4,14	-	+ (ei <i>mecA</i>)
1055	37,42	-	-	21,53	+	15,89	-	-
1084	-	-	-	36,82	-	-	-	-
1105	27,36	-	-	24,08	+	3,28	+	-
1119	-	-	-	-	-	-	-	-
1120	-	-	-	-	-	-	-	-
1124	34,73	-	-	29,56	+	5,17	-	-
1157	29,95	-	27,13	22,55	+	2,82	+ (MRSA)	+ (MRSA)
1150	35,35	-	-	21,4	+	13,95	-	-
1255	24,19	-	-	-	-	-	-	-
1096	22,88	-	30,74	22,86	+	0,02	+	+
1118	-	-	-	-	-	-	-	-
1127	20,8	-	-	20,92	+	-0,12	+	+
1170	35,71	-	23,51	23,36	+	12,35	-	-
1182	24,78	-	28,1	22,87	+	1,91	+	-
1220	-	-	-	22,22	-	-	-	-
1228	32,23	-	-	23,98	+	8,25	-	+
1229	36,42	-	-	20,1	+	16,32	-	+
1230	24,33	-	-	23,03	+	1,3	+	+
1231	23,57	-	-	23,3	+	0,27	+	+
1243	26,01	-	-	21,58	+	4,43	-	-
1253	24,48	-	28,14	25,02	+	-0,54	+	+
1279	23,96	-	-	20,96	+	3	+	-
1315	-	-	-	23,17	-	-	-	-
1333	-	-	32,03	29,59	-	-	-	-
1347	29,11	-	-	24,49	+	4,62	-	-
1348	26,61	-	-	22,15	+	4,46	-	-
1350	21,22	-	-	-	-	-	-	-
1358	-	-	-	23,7	-	-	-	-
1361	23,57	-	20,83	24,29	+	-0,72	+	+
1366	22,48	-	-	22,37	+	0,11	+	-
1443	-	-	-	23,42	-	-	-	-

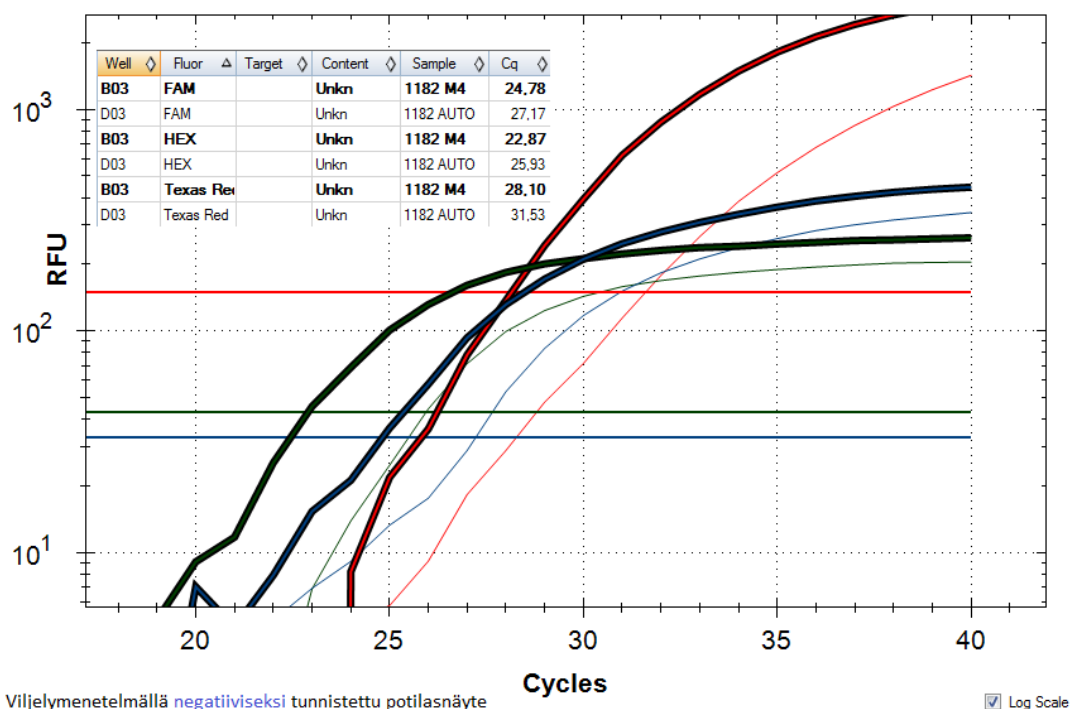
* Tämän näytteen tulosta ei huomioida vertailussa, sillä se antoi maljamenetelmällä ristiriitaisen tuloksen.

Maljamenetelmällä positiivisiksi tunnistetut näytteet olivat suurin osa (Taulukko 6 ja 7) selvästi positiivisia PCR-tuloksien mukaan myös menetelmällä 4 ja eristysautomaatilla eristettyinä (Kuvio 12).



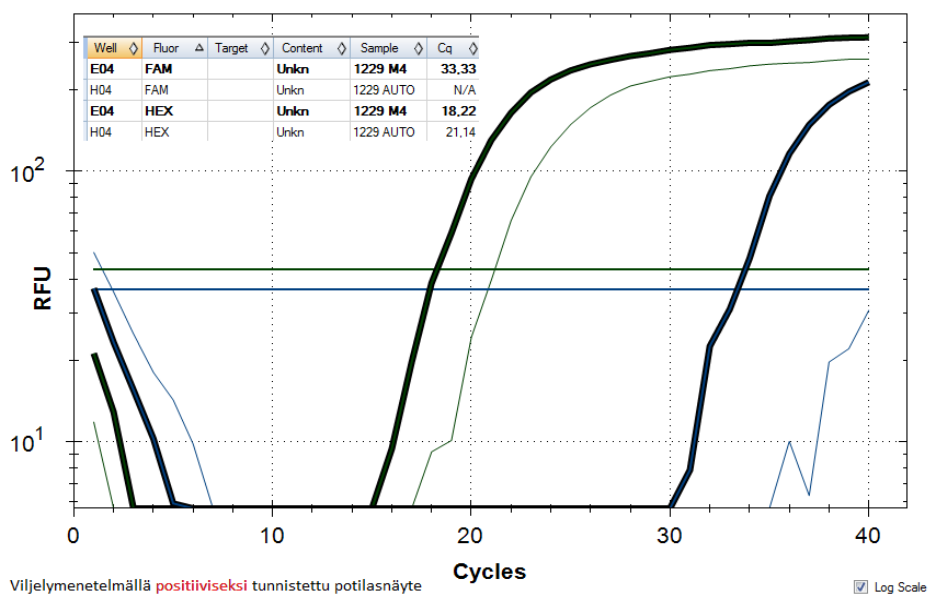
Kuvio 12. Positiivinen näyte eristettynä eristysautomaatilla ja menetelmällä 4 (tummennettu). FAM ja HEX nousevat lähes samalla syklillä.

Ongelmaksi koitui kuitenkin työssä käytetyistä kliinisistä näytteistä neljä multiplex qPCR-tekniikalla epäselviksi jäänyttä näytettä, joissa oli läsnä niin *mecA*-geeni että *S. pseudintermedius*. Mikäli maljamenetelmään on luottaminen, nämä olivat negatiivisia näytteitä, ja *mecA*-geeni oli lähtöisin jostakin muusta bakteerista. Sykleiltään ne kuitenkin monistuvivat niin lähekkäin, että niiden tulkitseminen positiivisiksi olisi myös ollut mahdollista (Kuvio 13). PCR-menetelmä on myös todennäköisesti maljamenetelmää herkempi, jolloin erot voivat olla selitettävissä myös sillä.



Kuvio 13. Viljelymenetelmällä negatiivinen näyte, missä on PCR:n mukaan läsnä *mecA*-geenin lisäksi myös *S. pseudintermedius* ja *S. aureus*.

Lisäksi yksi testattu näyte oli viljelymenetelmällä tunnistettu MRSP:ksi, mutta PCR:n tuloksen perusteella sen olisi voinut helposti tulkita negatiiviseksi. Siinä oli kyllä läsnä sekä *S. pseudintermedius* että *mecA*, mutta ne monistuivat niin eri sykleillä, että niiden ei uskoisi olevan peräisin samasta bakteerista (Kuvio 14). Tämä voi johtua myös her-
kän *S. pseudintermediuksen* läsnäolosta, jolloin näytteessä *nuc*-kopioiden määrä oli *mecA*-kopioiden määrää suurempi.



Kuvio 14. Viljelymenetelmällä positiiviseksi tunnistettu potilasnäyte, jossa *S. pseudintermedius* ja *mecA* kaukana toisistaan

PCR-menetelmän luotettavuutta arvioidessa positiivisten ja negatiivisten tulosten määrien perusteella PCR-tulos ja maljamenetelmällä saatu tulos poikkesi 39 näytteestä 14:sta (lähes 36 %), mikäli tuloksia ei tulkittu manuaalisesti monistustuotteiden Cq-arvojen erojen perusteella. Mikäli tulkintaa tehtiin, tulokset poikkesivat kuudessa näytteessä (alle 16 %). Yhtäläisyydet on kuvattu taulukossa 7.

Taulukko 7. Kliinisten potilasnäytteiden tulosten yhtäläisyydet PCR-menetelmällä ja maljamenetelmällä.

PCR:llä*	Maljamenetelmällä	
	+	-
+	9	14
-	0	15

Tulkittavissa **	Maljamenetelmällä	
	+	-
+	7	4
-	2	25

* Positiivinen tulos, kun näytteen PCR-ajo on monistanut sekä *mecA/mecC*-geenin että *S. pseudintermedius*-/*S.aureus*-bakteerin monistustuotteet

** Positiivinen tulos, kun näytteen PCR-ajon *mecA/mecC*-geenin ja *S. pseudintermedius*-/*S.aureus*-bakteerin monistustuotteiden Cq-arvojen etäisyys on alle 4.

Kaikkien tulosten valossa PCR-menetelmää ei siis voida pitää luotettavana ainoana käytössä olevana menetelmänä. Se osoittautuu kuitenkin toimivaksi tarkastettaessa

positiivista tulosta, sillä yksikään maljamenetelmällä positiivinen näyte ei ollut *mecA*-negatiivinen.

Myös menetelmiä vertailtiin kliinisten potilasnäytteiden testauksessa. PCR-tulosten mukaan keskiarvoja tarkastellessa potilasnäytteillä tehdyissä eristyksissä menetelmällä 1 ja 2 Cq-arvo jäi kaikkien fluoroforien osalta alhaisemmaksi kuin menetelmällä 4. Yhteenveto keskiarvoista on esitetty taulukossa 8.

Taulukko 8. PCR-tulosten vertailu menetelmillä M1, M2 ja M4 (n=16; klinisiä potilasnäytteitä).
Intensiteettitasot: TR:300, FAM:200, Cy5:150, HEX:100

Fluorofori (geeni)			Cy5 (<i>mecC</i>)	FAM (<i>mecA</i>)	HEX (<i>nuc S.pseud</i>)	Texas Red (<i>nuc S.aur</i>)
Menetelmä*	M1	Cq keskiarvo	-	28,90	25,16	25,56
		Keskihajonta	-	4,00	4,03	4,06
	M2	Cq keskiarvo	-	28,94	25,29	23,28
		Keskihajonta	-	4,02	4,02	4,02
	M4	Cq keskiarvo	-	27,45	23,39	23,06
		Keskihajonta	-	4,00	4,01	4,01

*M3 menetelmällä alustavissa ajoissa geenit jäivät joko monistumatta tai monistuivat myöhään, jonka vuoksi menetelmävertailua tällä ei jatkettu.

Eristysautomaatilla eristettyjen kliinisten potilasnäytteiden PCR-tuloksien antamia Cq-arvoja verraten vastaaviin arvoihin menetelmällä 4, oli ero vielä selkeämpi kuin manuaalisten menetelmien välillä. Cq-arvot olivat jokaisen fluoroforin osalta vähintään 0,45 suurempi menetelmällä 4. Texas Redin ja FAM:in osalta ero oli keskiarvoja tarkastellessa yli 1,5. Yhteenveto menetelmän 4 ja eristysautomaatin Bugs n' Beads -protokollan vertailutuloksista on esitetty taulukossa 9.

Taulukko 9. PCR-tulosten vertailu menetelmillä M4 ja eristysautomaatin Bugs n' Beads (n=31; klinisiä potilasnäytteitä)

Fluorofori (geeni)			Cy5 (<i>mecC</i>)*	FAM (<i>mecA</i>)	HEX (<i>nuc S.pseud</i>)	Texas Red (<i>nuc S.aur</i>)
Menetelmä	M4	Cq keskiarvo	28,68	27,91	24,44	26,64
		Keskihajonta	4,79	4,78	4,77	4,78
	Bugs n' Beads	Cq keskiarvo	29,13	28,77	26,12	28,33
		Keskihajonta	4,78	4,81	4,81	4,82

**mecC*-geenin tulos perustuu kahden potilasnäytteeseen lisättyyn LT-130 ympäin, koska luonnollisissa näytteissä tätä geneiä ei esiintynyt.

4.3 Kustannusten ja ajankäytön vertailu

Eri menetelmien välillä oli suuriakin kustannuseroja (Taulukko 10). Kallein oli eristysautomaatti, jonka olisi täten toivottu kuluttavan muita menetelmiä huomattavasti vähemmän työntekijän aikaa.

Taulukko 10. DNA-eristysmenetelmien kustannusten vertailu yhden näytteen osalta. Taulukossa ei ole huomioitu PCR-ajon kustannuksia, sillä ne ovat samat menetelmistä riippumatta. Myöskään suojakäsineiden osuutta ei laskettu.

	1 kpl hinta (€)	M1 (€)	M2 & M4 (€)	M3 (€)	Autom. (€)
Round-bottom tube	0,42	0,42	0,42	0	0
PBS 10 ml	0,11	0,11	0	0	0
0,5-5 ml kärjet	0,52	2,04	1,04	0	0
100-1000 µl kärjet	0,12	0,12	0	0,12	0,12
50 µl pitkät kärjet	0,26	0	0	0,26	0
Safelock Eppendorf -putki	0,15	0,15	0,15	0,15	0
Eppendorf-putki	0,11	0	0	0	0,22
400 µl Matrix	1,92	1,92	1,92	1,92	0
Bugs N' Beads -kitti	6,39	0	0	0	6,39
Yhteensä (€)		4,76	3,53	2,45	6,73

Ajankäytöllisesti lasketut tulokset olivat hieman yllättävät (Taulukko 11). Eristysautomaatin odotettiin olevan paljon manuaalisia menetelmiä nopeampi. Ajankäyttö tietysti riippuu paljon työn tekijästä, ja ajat on laskettu työhön jo rutinoituneen työntekijän työskentelystä. Mahdollisia ongelmia tai virheitä ja näiden korjaamisia ei ole myöskään voitu laskea.

Taulukko 11. Kulunut aika 10 näytteen valmisteluun PCR-ajoa varten (min)

Menetelmä	M1	M2	M3	M4		AUTO
Putkien merkkaus, näytteen pipetointi, sentrifugointi	17	17	7	17	Putkien merkkaus, näytteen pipetointi	8
Pesu ja sentrifugointi	17	-	-	-	Pipettien, kasettien ja näytteiden lataus	20
Resuspensointi matrixiin + siirto, vorteksointi	12	10	10	10	Ajo	38
1. inkubointi	60	60	20	20		
2. inkubointi	60	60	8	8		
Vorteksointi ja sentrifugointi	7	7	4	4		
Yhteensä (min)	173	154	49	59		66

Huonojen tulosten lisäksi hylätyssä eli alkuperäisessä menetelmässä sekä lisäkuluja että -aikaa aiheutui näytteen pesusta PBS-liuoksella. Sen sijaan menetelmä 3 olisi ollut kaikkia käsin tehtäviä menetelmiä nopeampi, mutta sen tulokset olivat niin huonot, ettei sitä voisi sen kannalta käyttää.

Laboratoriotyötä tekevän ajankäyttöön vaikuttaa paljon odotusaikaa vaativat työskentelyvaiheet, joita näissäkin menetelmissä oli runsaasti. Tarpeeksi pitkän odotusajan aikana työntekijä ehtii palata muiden töiden pariin, jolloin aikaa ei haaskata. Tällöin odotusajan tuoma pidempi aika koko menetelmän tekemiseen vaikuttaa vain tulosten saamiseen ja siihen, kuinka myöhään työpäivän aikana DNA-eristyksen voi aloittaa. Tämän takia laskettiin myös niin sanottu hands on -aika, eli se aika, mikä työntekijällä menee juuri tämän työn tekemisessä (Taulukko 12).

Taulukko 12. "Hands on" –aika eri menetelmien välillä (min)

Menetelmä	M1	M2	M3	M4		AUTO
Putkien merkkkaus, näytteen pipetointi	7	7	7	7	Putkien merkkkaus, näytteen pipetointi	8
Resuspensointi 10 ml PBS	7	0	0	0	Pipettien, kasettien ja näytteiden lataus	15-20
Resuspensointi 400 µl matrixiin + siirto eppariin, vorteksointi	12	10	10	10		
Vorteksointi	2	2	2	2		
Yhteensä (min)	28	19	19	19		23-28

Työntekijän aikaa kulutti eniten alkuperäinen menetelmä 1, mutta muiden menetelmien välillä ei ollut suurta eroa. Hieman yllättävää oli se, että eristysautomaatin käyttöön kului melko paljon aikaa.

4.4 Lopputulos

Työntekijälle kaikkein helpoin menetelmä olisi ollut käyttää eristysautomaattia, sillä siihen kaikki tarvittavat välineet olivat vain kyseiseen laitteeseen eikä töitä tarvinnut tehdä kuin yhdellä laitteella. Ennakko-odotuksista huolimatta se ei kuitenkaan ollut muita menetelmiä nopeampi. Eristysautomaatti myös antoi jopa heikompia DNA-konsentraatioita ja puhtausasteita muihin menetelmiin nähden. Lisäksi eristysautomaatin menetelmän kalleus ja laitteen hankintahinta huomioiden sen käyttöönotossa ei nähty järkeä. Alkuperäinen menetelmä oli hidas ja työläs, joten sitä kannatti ehdottomasti muuttaa. Lopulta päädyttiin projektin aikana kehitettyyn menetelmään 4, joka oli sekä nopein, että puhtaudeltaan ja DNA-konsentraatioltaan, jotka vaikuttivat menetelmän herkkyyteen, lähes paras. Vain sitä huomattavasti hitaampi menetelmä 2 tuotti aavistuksen korkeampia DNA-konsentraatioita.

4.5 Käytännön työskentely

Työskenneltäessä elävien organismien kanssa on otettava huomioon se, ettei niitä pysty täysin kontrolloimaan. Esimerkiksi maljakasvatuksissa oli tässäkin työssä huomattavissa, kuinka laimennossarjat eivät aina kasva maljoilla pesäkeluvun mukaan lineaarisesti, vaikka muuten testattaessa lineaarisuus olisi olemassa.

DNA-eristystä tehdessä resuspensoidessa soluja toiseen liuokseen sattui helposti vahinkoja. Solumassaa tuli helposti mukaan pipettiin pipetoidessa edellistä nestettä pois putkesta. Etenkin vanhemmissa, kauemmin jääkaapissa säilytetyissä rikaste-liemissä solumassa saattoi olla sentrifugoinnista huolimatta irtonaista. Tämä ongelma oli myös hyvin vähän massaa sisältävissä näytteissä testatessa pelkkiä bakteerikantoja.

Projektin aikana huomattiin, että jotkut maljamenetelmällä positiiviset näytteet antoivat PCR:ssä negatiivisiksikin tulkittavia tuloksia ja toisinpäin. Vaikeus johtuu siitä, että MRSA:ssa ja MRSP:ssä esiintyvää *mecA*- tai *mecC*-geeniä voi olla myös muissa bakteereissa, joita kliinisissä näytteissä esiintyy. Tämä osoittaa sen, ettei kumpikaan menetelmä ole yksinään luotettava, vaan parhaan tuloksen saamiseksi tulee käyttää sekä selektiivistä maljaa että PCR-ajoa.

Lähteet

- 1 Elfath M. Elnifro, Ahmed M. Ashshi, Robert J. Cooper, Paul E. Klapper. PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. Clin Microbiol Rev. 2000 Oct; 13(4): 559–570.
- 2 Edwards MC, Gibbs RA. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. PCR Methods Appl. 1994 Feb;3(4):S65-75.
- 3 Arrow. Isogen - Life Science. Verkkojulkaisu. <<http://www.isogen-lifescience.com/arrow#6>> Luettu 17.5.2016.
- 4 M. V. Boost, M. M. O'Donoghue, A. James. Prevalence of *Staphylococcus aureus* carriage among dogs and their owners. Epidemiol Infect. 2008 Jul; 136(7): 953–964.
- 5 Bio-Rad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Dr., Hercules. Instruction Manual. Chelex® 100 and Chelex 20 Chelating Ion Exchange Resin. Verkkojulkaisu. <http://www.bio-rad.com/webmaster/pdfs/9184_Chelex.PDF> Luettu 8.9.2016.
- 6 Bio-Rad. Chelex® 100 Resin. Verkkojulkaisu. <<http://www.bio-rad.com/en-us/product/chelex-100-resin>> Luettu 8.9.2016.
- 7 Evira, Eviran julkaisuja 1/2010. Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaarat. *Staphylococcus aureus*. Verkkojulkaisu. < https://www.evira.fi/globalassets/tietoa-eviras-ta/julkaisut/julkaisusarjat/elintarvikkeet/elintarvikkeiden_mikrobiologiset_vaarat.pdf > Luettu 17.5.2016.
- 8 Haajanen Kari, Pärssinen Raimo, Suominen Ilari, 2013. Nukleiinihappoliuosten (DNA/RNA) puhtauden ja pitoisuuden arviointi. Verkkodokumentti <http://www.edu.fi/download/143334_Nukleiinihappoliuosten_puhtauden_ja_pitoisuuden_arviointi.pdf> Luettu 20.6.2016
- 9 Haajanen Kari, Pärssinen Raimo, Suominen Ilari, 2013. PCR. Verkkodokumentti <http://www.edu.fi/download/143337_PCR.pdf> Luettu 8.9.2016
- 10 Himsworth, C.G, Patrick D.M, Parsons K, Feng A., Weese J.S. 2013. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in rats. Emerging Infectious Diseases. Verkkodokumentti. <<http://dx.doi.org/10.3201/eid1901.120897>> Luettu 20.6.2016.
- 11 Bio-Rad. InstaGene™ Matrix. Verkkojulkaisu. <<http://www.bio-rad.com/en-us/product/instagene-matrix>> Luettu 8.9.2016.
- 12 Bio-Rad. InstaGene™ Matrix. Catalog # 732-6030. Verkkojulkaisu. <<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT544.pdf>> Luettu 8.9.2016.
- 13 Lumio, Jukka 2016. MRSA (metisilliinille resistentti *Staphylococcus aureus*). Terveyskirjasto. Verkkojulkaisu. <http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00586> Luettu 20.6.2016.

- 14 PET MD. Antibiotic-Resistant Infections in Dogs. Verkkojulkaisu. <http://www.petmd.com/dog/conditions/skin/c_dg_mrsa-antibiotic-resistant-infections>. Luettu 19.8.2016.
- 15 Thermo Fisher Scientific Inc. Texas Red® (and Texas Red®-X) Dye, 2015. Verkkojulkaisu. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/texas-red.html#>> Luettu 11.9.2016.
- 16 Weese J.S, van Duijkeren E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. Vet Microbiol. 2010 Jan 27;140(3-4):418-29.
- 17 Worms & Germs, MRSP for pets owners, päivitetty 16.5.2011. Verkkojulkaisu. <<http://www.wormsandgermsblog.com/files/2008/04/JSW-MA3-MRSP-Owner.pdf>> Luettu 28.10.2016.
- 18 Engeline van Duijkeren Boudewijn Catry Christina Greko Miguel A. Moreno M. Constança Pomba Satu Pyörälä Modestas Ružauskas Pascal Sanders E. John Threlfall Jordi Torren-Edo Karolina Törneke. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. J Antimicrob Chemother (2011) 66 (12): 2705–2714.
- 19 Gavin K. Paterson, Ewan M. Harrison, Mark A. Holmes. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 2014 Jan; 22(1): 42–47.
- 20 BD. Instructions for use – Ready-to-use bottled media. BD Tryptic Soy Broth (TSB). Verkkojulkaisu. <<https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=30505>> Luettu 2.11.2016
- 21 Diasorin, The Diagnostic Specialist, 2013. Bugs'n Beads™.Kit. Instructions For Use. Verkkojulkaisu. <<http://uk.werfen.com/~media/il%20uk/docs/diasorin/ifu%20120102%20%20%20bugs%20n%20beads%20english.pdf>> Luettu 2.11.2016
- 22 Takashi Sasaki, Ken Kikuchi, Yoshikazu Tanaka, Namiko Takahashi, Shinichi Kamata, Keiichi Hiramatsu, 2007. Reclassification of Phenotypically Identified *Staphylococcus intermedius* Strains. J Clin Microbiol. 2007 Sep; 45(9): 2770–2778.
- 23 Jurate Sleiniute, Jurate Siugzdaite, 2015. Acta Vet. Distribution of coagulase-positive staphylococci in humans and dogs. Verkkojulkaisu. <https://actavet.vfu.cz/media/pdf/actavet_2015084040313.pdf> Luettu 16.2.2017
- 24 Siun Chee Tan, Beow Chin Yiap, 2009. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. J Biomed Biotechnol. 2009: 574398. Luettu 6.3.2017.
- 25 Alaska BioPREP Virtual Textbook, 2017. The Basics of DNA Extraction. Verkkojulkaisu. <<https://bioprep.community.uaf.edu/learning-modules/2-dna-extraction-4/the-basics-of-dna-extraction/https/>> Luettu 6.3.2017.
- 26 Lim Daniel, 1998. Microbiology, 328, 518, 526. Yhdysvallat: WCB/McGraw-Hill. Luettu 6.3.2017.

- 27 ATDBio Ltd. 2005-2017. FAM (fluorescein), HEX, JOE, ROX, TAMRA, TET, Texas Red® and others. Verkkodokumentti.
<<http://www.atdbio.com/content/33/FAM-fluorescein-HEX-JOE-ROX-TAMRA-TET-Texas-Red-and-others>> Luettu 6.3.2017.
- 28 Thermo Fisher Scientific, 2017. Cy5 dye. Verkkodokumentti.
<<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/cy5-dye.html>> Luettu 6.3.2017.
- 29 Thomas Grönthal, Matti Ollilainen, Marjut Eklund, Heli Piiparinen, Veera Gindonis, Jouni Junnila, Leena Saijonmaa-Koulumies, Riitta Liimatainen, Merja Rantala, 2015. Epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in guide dogs in Finland. Acta Vet Scandinavica 57:37. Luettu 1.9.2017

NanoDrop-mittaukset

DNA-konsentraation ja -puhtauden mittaus NanoDropilla

Detection limit: 2 ng/μl (dsDNA)

Ideaali A260/A280 suhde puhtaalla DNA:lla 1,8

Kanta	Lai- mennos	Mene- telmä	Konsentraatio (ng/μl)	A26 0	A28 0	Puhtaus (A260/A280)	vrt. 1,8
K-8	10 ⁻¹	M1	16,9	0,33 9	0,16 7	2,030	
	10 ⁻²	M1	1,4	0,028	0,011	2,545	
	10 ⁻³	M1	0,5	0,0105	0,013	0,808	
	10 ⁻⁴	M1	1,6	0,033	0,008	4,125	
	10 ⁻⁵	M1	2,0	0,041	0,017	2,412	
	10 ⁻¹	M2	106,2	2,12 5	1,56 3	1,360	
	10 ⁻²	M2	81,5	1,63 0	1,31 8	1,237	
	10 ⁻³	M2	84,3	1,68 6	1,39 1	1,212	
	10 ⁻⁴	M2	41,1	0,82 1	0,67 5	1,216	
	10 ⁻⁵	M2	27,4	0,54 8	0,44 5	1,231	
	10 ⁻¹	M3	86,4	1,72 8	1,45 1	1,191	
	10 ⁻²	M3	85,15	1,70 25	1,33 5	1,275	
	10 ⁻³	M3	85,4	1,70 8	1,40 0	1,220	
	10 ⁻⁴	M3	85,6	1,71 3	1,40 4	1,220	
	10 ⁻⁵	M3	85,7	1,71 5	1,39 5	1,229	
	10 ⁻¹	M4	71,5	1,42 9	1,09 3	1,307	
	10 ⁻²	M4	83,38	1,37 5	1,05 1	1,308	
	10 ⁻³	M4	76,0	1,52	1,26 3	1,203	
	10 ⁻⁴	M4	61,2	1,22 3	1,01 3	1,207	
	10 ⁻⁵	M4	43,5	0,86	0,70	1,231	

				9	6	
K-16	10^{-1}	M1	9,7	0,19 4	0,09 7	2,000
	10^{-2}	M1	3,1	0,062	0,029	2,138
	10^{-3}	M1	2,2	0,045	0,014	3,214
	10^{-4}	M1	2,1	0,042	0,009	4,667
	10^{-5}	M1	2,3	0,045	0,019	2,368
	10^{-1}	M2	125,0	2,50 0	1,91 9	1,303
	10^{-2}	M2	70,4	1,40 8	1,12 3	1,254
	10^{-3}	M2	74,9	1,49 7	1,21 3	1,234
	10^{-4}	M2	37,4	0,74 8	0,61 5	1,216
	10^{-5}	M2	45,5	0,91	0,74 5	1,221
	10^{-1}	M3	86,2	1,72 5	1,46 5	1,177
	10^{-2}	M3	85,5	1,70 9	1,42 7	1,198
	10^{-3}	M3	83,7	1,67 4	1,37 8	1,215
	10^{-4}	M3	81,2	1,62 4	1,33 2	1,219
	10^{-5}	M3	87,3	1,74 5	1,46 3	1,193
	10^{-1}	M4	86,3	1,72 5	1,37 8	1,252
	10^{-2}	M4	56,3	1,12 5	0,91 9	1,224
	10^{-3}	M4	32,0	0,63 9	0,50 4	1,268
	10^{-4}	M4	34,5	0,68 9	0,56 1	1,228
	10^{-5}	M4	42,6	0,85 2	0,69 7	1,222
LT-130	10^{-1}	M1	19,2	0,38 4	0,17 6	2,182
	10^{-2}	M1	3,7	0,07 4	0,03 8	1,947
	10^{-3}	M1	2,0	0,041	0,009	4,556
	10^{-4}	M1	2,1	0,042	0,025	1,680
	10^{-5}	M1	1,8	0,035	0	-
	10^{-1}	M2	118,7	2,37	1,73	1,371

				3	1	
	10 ⁻²	M2	54,3	1,08 7	0,87 0	1,249
	10 ⁻³	M2	69,8	1,39 7	1,11 1	1,257
	10 ⁻⁴	M2	75,5	1,51 0	1,24 2	1,216
	10 ⁻⁵	M2	49,1	0,98 2	0,79 9	1,229
	10 ⁻¹	M3	85,8	1,71 6	1,43 5	1,196
	10 ⁻²	M3	87,1	1,74 2	1,46	1,193
	10 ⁻³	M3	85,9	1,71 9	1,30 0	1,322
	10 ⁻⁴	M3	92,7	1,85 3	1,55 1	1,195
	10 ⁻⁵	M3	86,5	1,73 0	1,43 2	1,208
	10 ⁻¹	M4	82,0	1,64 0	1,25 9	1,303
	10 ⁻²	M4	55,7	1,11 3	0,9	1,237
	10 ⁻³	M4	67,7	1,35 4	1,11	1,220
	10 ⁻⁴	M4	54,6	1,09 1	0,88 6	1,231
	10 ⁻⁵	M4	33,2	0,66 3	0,53 2	1,246
	K-10	-	M1	149,2	2,98 5	1,29 9
	-	M2	420,0	8,40 0	4,21 2	1,994
	-	M3	87,7	1,75 3	1,41 5	1,239
Seos: K-8 + K-16 + LT-130	10 ⁻¹	M1	14,5	0,29 1	0,13 7	2,124
	10 ⁻²	M1	0,8	0,017	0,002	8,500
	10 ⁻³	M1	-0,5	-0,011	-0,006	1,833
	10 ⁻⁴	M1	-0,7	-0,013	-0,009	1,444
	10 ⁻⁵	M1	-1,0	-0,02	-0,015	1,333
	10 ⁻¹	M2	105,6	2,11 1	1,57 3	1,342
	10 ⁻²	M2	78,6	1,57 1	1,29 3	1,215
	10 ⁻³	M2	55,7	1,11	0,92	1,200

				5	9	
	10^{-4}	M2	76,2	1,52 4	1,32 3	1,152
	10^{-5}	M2	66,1	1,32 3	1,12 0	1,181
	10^{-1}	M3	93,6	1,87 1	1,55 4	1,204
	10^{-2}	M3	95,4	1,90 9	1,54 8	1,233
	10^{-3}	M3	95,5	1,91 1	1,53 6	1,244
	10^{-4}	M3	96,4	1,92 9	1,56 6	1,232
	10^{-5}	M3	99,6	1,99 2	1,57 5	1,265
Potilasnäyte1 (Jawa)	-	M1	133,6	2,67 2	1,37 3	1,946
Potilasnäyte2 (Ora)	-	M2	196,5	3,93	2,27 3	1,729
Potilasnäyte3 (Ren)	-	M2	274,2	5,48 4	3,01 4	1,820
Potilasnäyte4 (Lego)	-	M2	252,9	5,05 8	2,70 5	1,870

2016-910	-	AUTO	28,4	0,56 9	0,54 3	1,048
	-	M1	46,2	0,92 3	0,13 7	6,737
	-	M2	221,7	4,43 4	2,39	1,855
	-	M4	136,6	2,73 3	1,52	1,798
2016-911	-	AUTO	26,8	0,53 6	0,51 6	1,039
2016-912	-	AUTO	27,2	0,54 5	0,52 8	1,032
2016-924	-	AUTO	32,7	0,65 4	0,57 7	1,133
2016-948	-	AUTO	31,2	0,62 5	0,54 4	1,149
2016-975	-	AUTO	18,9	0,37 9	0,51 5	0,736
	-	M1	10,5	0,22 1	- 0,22 8	-0,969
	-	M2	157,3	3,14 5	1,85	1,700

	-	M4	136,7	2,73 4	1,68 2	1,625
2016-1001	-	AUTO	34,1	0,68 2	0,61 1	1,116
2016-1053	-	AUTO	29,2	0,58 5	0,56 3	1,039
2016-1064	-	AUTO	36,9	0,73 7	0,63 2	1,166
	-	M1	36,7	0,73 4	0,00 9	81,556
	-	M2	153	3,06 1	1,80 8	1,693
	-	M4	87,9	1,75 9	1 1	1,759
2016-1079	-	AUTO	37,7	0,75 4	0,65 8	1,146

Eristysautomaatilla eristettyjen DNA-näytteiden NanoDrop-mittaukset

Vertauksia eri menetelmiin sekä eri liuoksilla nollatulla laitteella mitattuihin näytteisiin.

Normaalit ja TSB:hen suspensoidut näytteet

Blank	Menetelmä	Näyte	c	Puhtaus	vrt. 1,8
Vesi	A	1253	35,2	1,16	
Eluointiliuos	A		32,3	1,45	
Matrix	M4		847,6	1,7	
Vesi	M4		132,9	1,58	
Vesi	A	1253	86,1	1,36	
Eluointiliuos	A	TSB	84,2	1,55	
Vesi	A	1315	51,9	1,22	
Eluointiliuos	A		39	1,5	
Matrix	M4		976,4	1,7	
Vesi	A		55,8	1,33	
Eluointiliuos	A	TSB	43,5	1,69	
Vesi	A	1366	54,2	1,23	
Eluointiliuos	A		42,9	1,49	
Matrix	M4		900,7	1,68	
Vesi	A		140,9	1,49	
Eluointiliuos	A	TSB	127,6	1,63	
Vesi	A	PN5	48,8	1,16	
Eluointiliuos	A		35,9	1,41	
Matrix	M4		983,9	1,71	
Vesi	A		198,6	1,36	
Eluointiliuos	A	PN5 TSB	180,2	1,42	
Vesi	A	1333	52,8	1,2	
Eluointiliuos	A		39,5	1,42	
Matrix	M4		893,9	1,71	
Vesi	M4		180,4	1,67	
Vesi	A	1347	50,8	1,15	
Eluointiliuos	A		39,6	1,38	
Matrix	M4		1124,5	1,82	
Vesi	A		53	1,2	
Eluointiliuos	A	1348	40,8	1,43	
Matrix	M4		831,7	1,74	
Vesi	A		52,1	1,16	
Eluointiliuos	A		40,1	1,38	
Matrix	M4	1350	967,8	1,79	

Tiivistettynä:

Blank	Menetelmä	Näyte	c	Puhtaus
Eluointiliuos	A	1253	32,3	1,45
Vesi	M4	1253	132,9	1,58
Eluointiliuos	A	1253 TSB	84,2	1,55
Eluointiliuos	A	1315	39	1,5
Eluointiliuos	A	1315 TSB	43,5	1,69
Eluointiliuos	A	1366	42,9	1,49
Eluointiliuos	A	1366 TSB	127,6	1,63
Eluointiliuos	A	PN5	35,9	1,41
Eluointiliuos	A	PN5 TSB	180,2	1,42
Eluointiliuos	A	1333	39,5	1,42
Vesi	M4	1333	180,4	1,67
Eluointiliuos	A	1347	39,6	1,38
Eluointiliuos	A	1348	40,8	1,43
Eluointiliuos	A	1350	40,1	1,38

TSB:HEN LAIMENNETUT NÄYTEET

Blank	Menetelmä	Näyte	c	Puhtaus
Vesi	M4	1231	198,3	1,52
Vesi	M4	1:2	127	1,54
Vesi	M4	1:4	73,3	1,51
Eluointiliuos	A	1231	32,5	1,51
Eluointiliuos	A	1:2	31,4	1,52
Eluointiliuos	A	1:4	58,5	1,58
Vesi	M4	1243	161,8	1,33
Vesi	M4	1:2	96,7	1,42
Vesi	M4	1:4	36,6	1,6
Eluointiliuos	A	1243	35,5	1,46
Eluointiliuos	A	1:2	29,2	1,53
Eluointiliuos	A	1:4	47,3	1,6
Vesi	M4	1358	249,4	1,75
Vesi	M4	1:2	134,9	1,53
Vesi	M4	1:4	123,4	1,52
Eluointiliuos	A	1358	36,2	1,54
Eluointiliuos	A	1:2	31	1,58
Eluointiliuos	A	1:4	57	1,67
Vesi	M4	1361	324,7	1,76
Vesi	M4	1:2	202,4	1,84
Vesi	M4	1:4	126,5	1,81

Eluointiliuos	A	1361	40,8	1,45
Eluointiliuos	A	1:2	36,7	1,53
Eluointiliuos	A	1:4	67,4	1,57
Vesi	M4	1443	282,1	1,59
Vesi	M4	1:2	161,8	1,61
Vesi	M4	1:4	94	1,62
Eluointiliuos	A	1443	27,3	1,59
Eluointiliuos	A	1:2	30,3	1,52
Eluointiliuos	A	1:4	61,7	1,6

Ensimmäiset testiajot

PCR-ajot kontrolli- ja laaduntarkkailukannoilla

